

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE MEDICHE SPECIALISTICHE

Ciclo XXVIII

Settore Concorsuale di afferenza: 06/E1

Settore Scientifico disciplinare: MED/21

TITOLO TESI

RUOLO DELL'IMAGING MOLECOLARE NELLA
VALUTAZIONE DELL'IPOSSIA NEI TUMORI SOLIDI

Presentata da: Dr.ssa EGESTA LOPCI

Coordinatore Dottorato

Ch.^{mo} Prof. Roberto Di Bartolomeo

Relatore

Ch.^{mo} Prof. Sandro Mattioli

Correlatore

Ch.^{mo} Prof. Stefano Fanti

Esame finale anno 2016

Title: THE ROLE OF MOLECULAR IMAGING FOR THE EVALUATION OF HYPOXIA IN SOLID TUMORS

ABSTRACT

Hypoxia is a pathological condition caused by a reduced oxygen supply at the tissue level. Since the 60's, Tomlinson and Gray have demonstrated the presence of regions of poor oxygenation in lung cancer, and noted that this characteristic of tumor microenvironment is associated to increased resistance to radiotherapy. The detection of hypoxia in tumors is therefore of utmost clinical relevance, because tumor aggressiveness, metastatic drift, failure to disease control, increased risk of recurrence and ultimately poor outcome are associated with hypoxia.

In recent decades, there has been an increasing interest in developing methods for the assessment of tumor oxygenation. These methods can be invasive, such as the polarographic O₂-sensor, or non-invasive, mainly based on imaging techniques. Imaging modalities are undoubtedly the most appealing techniques for this purpose, because they guarantee an all-encompassing visualization of the pathological tissue and can identify the phenomenon even at sites inaccessible to invasive procedures.

Among the image-based modalities for hypoxia assessment, positron emission tomography (PET) is one of the most extensively investigated, because it offers: (a) broad assortment of radiopharmaceuticals; (b) good intrinsic resolution; (c) three-dimensional (3D) tumor representation; (d) (semi)quantification of the hypoxic burden; (e) patient friendliness, and (f) reproducibility.

The object of the current thesis is to investigate the role of molecular imaging with PET in cancer hypoxia. The text is divided into four different sessions focused on giving at first an insight on principal radiopharmaceuticals applied for hypoxia imaging (Session-1), then concentrating on the correlation of tissue expression of hypoxia and imaging findings on 18F-FDG PET/CT (Session-2). The next two sessions will analyze the prognostic impact of the hypoxia-specific tracer (64Cu-ATSM) in solid tumors (Session-3), followed by a sophisticated *ad hoc* computer-aided fractal geometry based analysis of DICOM images for early and late acquisitions on 64Cu-ATSM PET/CT in solid tumors (Session-4).

INDICE

SESSIONE 1	3
TRACCIANTI PET PER LA VALUTAZIONE DELL'IPOSSIA	
Introduzione	4
Fluorodeossiglucosio (18F-FDG)	7
Fluoromisonidazolo (18F-MISO)	8
Cu-diacetil-bis(N4-metiltiosemicarbazone)(Cu-ATSM).....	13
Bibliografia	18
SESSIONE 2	28
CORRELAZIONE TRA I MARKATORI TISSUTALI D'IPOSSIA E LA PET CON FDG	
Abstract	29
Introduzione	31
Materiali e Metodi	32
Risultati	34
Discussione	35
Bibliografia	38
SESSIONE 3	40
VALORE PROGNOSTICO DEL CU-ATSM NEI TUMORI SOLIDI	
Abstract	41
Introduzione	43
Materiali e Metodi	44
Risultati	46
Discussione	51
Bibliografia	54
SESSIONE 4	57
CONFRONTO TRA LE IMMAGINI PRECOCI E TARDIVE ALLA PET CON CU-ATSM	
Abstract	58
Introduzione	60
Materiali e Metodi	61
Risultati	62
Discussione	64
Bibliografia	69
RINGRAZIAMENTI	71

TRACCIANTI PET PER LA VALUTAZIONE DELL'IPOSSIA

NOTE: Ai fini del progetto di ricerca afferente al dottorato in Scienze Mediche Specialistiche del XXVIII ciclo, il contenuto della presente sessione è stato pubblicato: *Lopci et al. Am J Nucl Med Mol Imaging 2014;4(4):365-84*. Il testo è riprodotto in Italiano previa autorizzazione dell'editore Weibo Cai, PhD.

INTRODUZIONE

L'ipossia è una condizione patologica determinata da un ridotto apporto di ossigeno a livello tissutale. Questo fenomeno è presente nei tumori solidi in oltre 50-60% dei casi ed è solitamente associato a una prognosi peggiore [1]. L'insorgenza dell'ipossia nei tumori è spesso il risultato di una perfusione anomala, che è tipica dell'angiogenesi tumore relata, ed è prevalentemente causa di un'ipossia transitoria (ipossia acuta). In altri casi, l'ipossia è determinata da un'insufficiente diffusione dell'ossigeno dovuta alla lunga distanza tra il tessuto coinvolto e il vaso sanguigno più vicino (ipossia cronica) [2]. Un altro meccanismo d'induzione dell'ipossia è secondario all'alterato trasporto di ossigeno, tipicamente a livello sistemico, come accade ad esempio alla presenza di malattie e/o trattamenti che inducono anemia [1, 3-6]. I primi a dimostrare la presenza d'ipossia nei tumori umani furono Tomlinson e Gray [2], i quali negli anni '60 osservarono che oltre i 100µm dal vaso sanguigno più vicino (**Fig. 1**), che corrisponde alla distanza di diffusione dell'ossigeno solubile, nei tumori si manifesta la necrosi. In generale, la pressione media di ossigeno (pO₂) in cui i tessuti viventi diventano ipossici è intorno 8-10 mmHg [7, 8].

L'epifenomeno *ipossia* è tradotto a valle in una cascata di meccanismi di adattamento cellulare, per lo più mediati dagli *hypoxia inducible factors* 1 e 2 (HIF-1α e HIF-2) [4], che innescano l'attivazione di geni coinvolti nella glicolisi, nella proliferazione cellulare, nell'induzione dell'angiogenesi, nella facilitazione dell'invasione metastatica, ecc [4, 9]. Questo pattern di espressione genica altera il potenziale maligno dei tumori, in seguito al quale le cellule tumorali possono diventare resistenti alla terapia con radiazioni e/o alla chemioterapia [10, 11]. Come riportato da Poste e Van Meir, il livello di attivazione genica di HIF è una funzione della concentrazione di ossigeno e aumenta esponenzialmente quando i livelli di O₂ sono inferiori al 5% [12].

Il fatto che l'ipossia tumorale aumenti la resistenza alla terapia, ed in particolare alla radioterapia, è un fatto noto da decenni. Pertanto, la determinazione di questo fenomeno nei tumori solidi è d'importante rilevanza clinica, perché l'aggressività tumorale, la tendenza alla diffusione metastatica, la mancata risposta alla terapia e l'aumento del tasso di recidiva sono tutti associati alla presenza d'ipossia [13]. Di conseguenza, negli anni c'è stato un considerevole interesse nello sviluppo di metodi per la misurazione dei livelli di ossigeno a livello tumorale. Tra questi vi sono sia metodi invasivi, come il metodo polarografico di misurazione dell'ossigeno (Eppendorf GmbH, Hamburg, Germania) e sia quelli non invasivi, basati principalmente sulla diagnostica per immagini [10]. Le modalità

d'imaging sono senza dubbio quelle più attrattive per la valutazione dell'ipossia tumorale, perché garantiscono una visualizzazione a 360° del tessuto neoplastico e sono in grado di identificare il fenomeno anche in distretti inaccessibili alle procedure invasive, come il metodo polarografico mediante Eppendorf. Tra le molte tecniche non invasive attualmente disponibili troviamo i metodi ottici, quelli basati sulla risonanza magnetica nucleare (RMN), e le tecniche di medicina nucleare [14, 15]. Alcune delle principali caratteristiche di queste modalità e le loro limitazioni sono riassunte nella **tabella 1**.

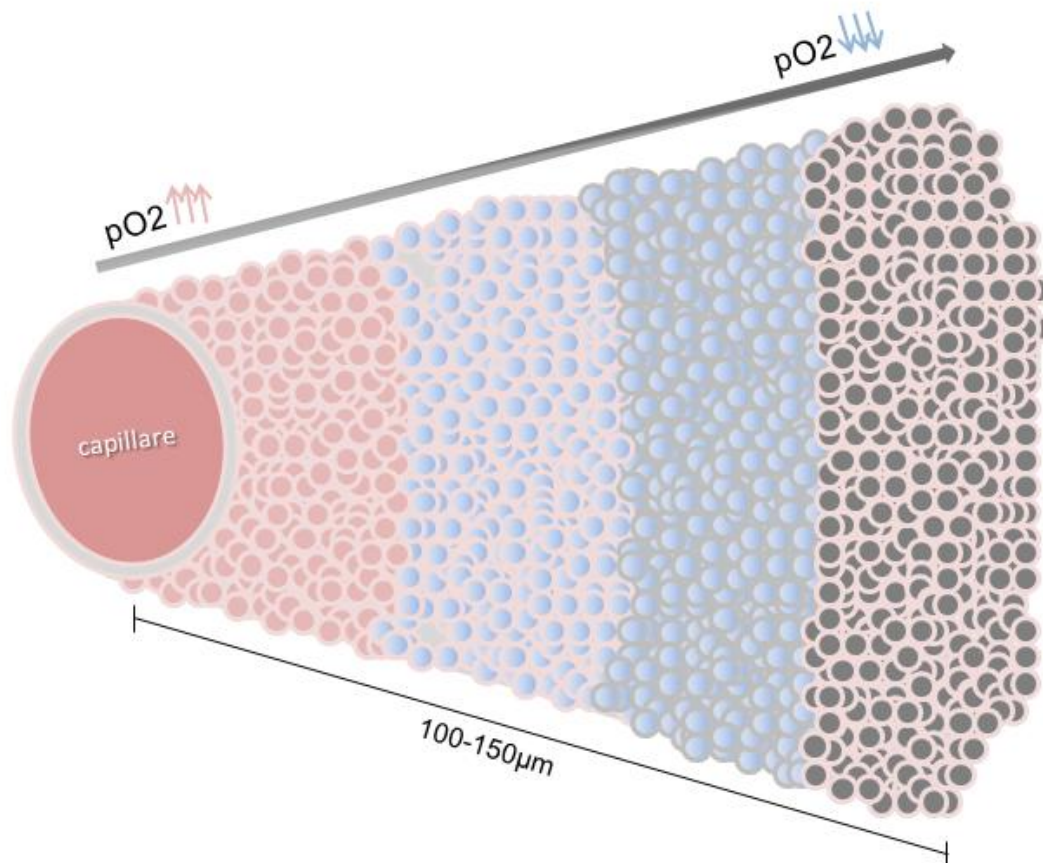


Figura 1: Riproduzione figurata dell'impatto sui tessuti della riduzione della pO2 man mano che ci si allontana dal vaso sanguigno.

Tra le modalità sopraelencate per la valutazione tissutale dell'ipossia troviamo la tomografia a emissione di positroni (PET), che è una delle tecniche d'imaging più studiate. Rispetto alle altre modalità essa presenta diversi vantaggi dovuti a: (a) un vasto assortimento di radiofarmaci; (b) una buona risoluzione intrinseca (~5mm); (c) una rappresentazione tridimensionale (3D) del tumore; (d) la possibilità di fare valutazioni semiquantitative/quantificazione del carico tumorale ipossico; (e) la facilità di esecuzione; e (f), la riproducibilità dei dati [16]. Rispetto alle altre tecniche non invasive, tuttavia, il

vantaggio maggiore della PET è la più alta specificità diagnostica nella caratterizzazione del tessuto ipossico [17].

Tabella 1: Riassunto delle principali metodiche diagnostiche per la valutazione non invasiva dell'ipossia [14,15, 18-21].

Modalità di Imaging		Tipo di determinazione	Limitazioni
Ottico	Fluorescenza	Infusione di sonde di fosforo idrosolubili nel circolo sistemico per valutare la pO ₂	La misura rappresenta la pO ₂ vascolare e non quella dei tessuti
	Spettroscopia nel vicino infrarosso (NIRS)	Valutazione non invasiva della saturazione dell'emoglobina (Hb)	La misurazione fornisce informazioni sull'ossigenazione vascolare, ma non sulla pO ₂ del tessuto.
RMN	Blood oxygen level-dependent magnetic resonance imaging (BOLD MRI)	Le immagini BOLD rivelano i cambiamenti nella quantità di ossigeno legato all'emoglobina nel sangue grazie alla deossiemoglobina, che è una sostanza paramagnetica.	La misurazione fornisce informazioni sulle variazioni dell'ossigenazione del sangue, ma non sulla concentrazione assoluta di ossigeno nei tessuti.
	¹⁹ F-MRI or NMR (nuclear magnetic resonance)	I perfluorocarburi (PFC) vengono iniettati per via endovenosa e il loro tasso di rilassamento del spin ¹⁹ F reticolo (R1) varia linearmente con la concentrazione di ossigeno disciolto	La velocità di rilassamento di ¹⁹ F può dipendere da altri fattori fisiologici presenti nel tessuto e non solo dalla concentrazione di O ₂
	Electron paramagnetic resonance imaging (EPRI)	Uso di particelle paramagnetiche impiantabili o sonde solubili, iniettate per via endovenosa, che interagiscono fisicamente con l'ossigeno.	Le molecole possono distribuirsi prevalentemente nel sistema vascolare, biasando in tal modo la misura parte di dell'ossigenazione dei tessuti.
	Proton–electron double resonance imaging (PEDRI)	Iniezione di una sonda esterna che ha elettroni spaiati e utilizzo di un forte impulso EPR.	Le molecole possono distribuirsi prevalentemente nel sistema vascolare, biasando in tal modo la misura parte di dell'ossigenazione dei tessuti.
	DCE-MRI (dynamic Gd-DTPA-enhanced MRI)	Iniezione di mezzo di contrasto per la determinazione della perfusione/permeabilità vascolare	Bassa specificità, perché la misurazione fornisce informazioni su entrambi i distretti, cioè vascolare e tissutale
Nucleare	Single-photon emission computed tomography (SPECT)	Iniezione di radiofarmaci che emettono raggi gamma (γ) selettivi per il tessuto ipossico.	Risoluzione limitata dipendente dalla distribuzione voxel-based dell'ipossia.
	Positron emission tomography (PET)	Iniezione di radiofarmaci che emettono positroni (β ⁺) selettivi per il tessuto ipossico. Alta specificità.	Risoluzione limitata rispetto alla RMN e ai metodi ottici, ma superiore alla SPECT.

Abbreviazioni: NIRS = near-infrared spectroscopy; MRI = magnetic resonance imaging; EPR = electron paramagnetic resonance

Partendo con la famiglia dei composti 2-nitroimidazolici nei primi anni 1980 [15, 22], un ampio numero di traccianti PET sono ad ora stati sviluppati per l'identificazione dell'ipossia nei tessuti viventi e nei tumori solidi (**tabella 2**) [3, 15, 23]. Nei paragrafi a seguire verranno esposte le potenzialità e gli svantaggi di alcuni di questi traccianti impiegati in oncologia.

18F-FLUORODEOSSIGLUCOSIO (18F-FDG)

Il 18F-FDG è la forma fluorurata del 2-deossi-d-glucosio, e rappresenta un analogo del glucosio sviluppato per valutare il metabolismo glucidico dei tessuti. Il 18F-FDG è il tracciante PET maggiormente utilizzato in oncologia in quanto le cellule tumorali mostrano solitamente un aumento del loro metabolismo e in particolare della glicolisi, anche in condizioni di aerobiosi, fenomeno questo noto anche come effetto Warburg. Una volta introdotto nell'organismo, il 18F-FDG è attivamente trasportato nelle cellule dai trasportatori del glucosio (GLUT) e poi fosforilati a FDG-6-fosfato dall'enzima esochinasi (HK). A questo punto il FDG-6-fosfato non può più procedere oltre nella via glicolitica, perché la maggior parte delle cellule tumorali non contengono una quantità sufficiente di enzima glucosio-6-fosfatasi per invertire la fosforilazione, determinando così l'intrappolamento intracellulare della molecola. Indubbiamente la 18F-FDG PET resta una delle indagini principali per la valutazione del tumore in stadiazione, durante la terapia per determinare la risposta, e nel sospetto di recidiva. Inoltre la metodica fornisce informazioni sulla prognosi della malattia, ma richiede una gestione oculata quando si cerca di valutare l'ipossia tumorale. Questo deriva dal fatto che l'ipossia, attraverso HIF-1 α , può indurre la sovra espressione dei GLUT e degli enzimi glicolitici [23, 24], giustificando solo in parte l'uso del 18F-FDG come marker surrogato dell'ipossia [25]. Infatti, sappiamo che in caso di riduzione dei livelli di ossigeno ($pO_2 \downarrow$), le cellule viventi seguono come via metabolica per la produzione dell'ATP la glicolisi anaerobica, fenomeno questo noto anche come effetto Pasteur [26] (**Fig.2A**). Pertanto, in condizioni ipossiche, esiste un'ampia sovrapposizione tra la captazione di 18F-FDG causata dalla glicolisi aerobica (effetto Warburg) [27], e la sopracitata glicolisi anaerobica [26, 28] (cioè, normossia e ipossia, rispettivamente).

Il fatto che l'espressione di HIF-1 α possa essere osservata anche nelle regioni non-ipossiche del tumore [29, 30] suggerisce che altri fattori possono influenzare indirettamente il metabolismo del glucosio e la captazione del 18F-FDG in quelle zone

[23]. Appare quindi comprensibile il motivo per cui, in molti esperimenti, la correlazione tra accumulo di 18F-FDG e il livello di ipossia nel tumore non sia stata confermata o i risultati ottenuti siano contrastanti [3, 31]. Queste osservazioni si applicano a diversi tipi di tumore, tra cui quelli del testa-collo, il carcinoma polmonare non a piccole cellule (NSCLC), i sarcomi, il carcinoma della mammella, i tumori cerebrali, il carcinoma gastrico [32], il tumore della lingua [33], ecc. Ad esempio, in due diversi studi di rispettivamente di 24 e 36 pazienti con carcinoma squamoso del testa collo [34, 35], il confronto diretto tra accumulo di 18F-FDG e l'ipossia determinata utilizzando un sensore polarografico per O₂ ha documentato una mancanza di correlazione. Allo stesso modo, nessuna correlazione è stata osservata tra il metabolismo glucidico alla 18F-FDG PET e l'ipossia nei pazienti con NSCLC [36, 37]. Questi dati non sono da considerare solo in senso negativo, perché la captazione alla 18F-FDG PET è in grado di definire i tipi di tumore più aggressivi e di fornire un'importante stima prognostica, anche correlata all'espressione di HIF-1 α . Tuttavia, queste osservazioni limitano l'applicazione della 18F-FDG PET per la determinazione dell'ipossia tumorale, indirizzando in tale caso verso l'impiego di traccianti più specifici [26].

18F-FLUOROMISONIDAZOLO (18F-FMISO)

Il 18F-fluoromisonidazolo è il derivato fluorurato del nitroimidazolo e rappresenta il tracciante PET più studiato per l'imaging dell'ipossia. Il 18F-FMISO è stato sviluppato per questo scopo nel 1986 [38, 39] e da allora è stato ampiamente utilizzato per la determinazione dell'ipossia in molti tipi di tumore sia in preclinica che nel contesto clinico [3, 15]. Come per gli altri composti della famiglia dei nitroimidazolici, questo tracciante si diffonde passivamente attraverso la membrana cellulare a causa della sua lipofilia, e una volta nell'ambiente intracellulare viene ridotto in radicali R-NO₂ dall'enzima nitroreduttasi (NTR) (**Fig.2B**). Questo processo è reversibile e quando la cellula è ben ossigenata, il tracciante non viene intrappolato e può fluire liberamente nell'ambiente extracellulare. Al contrario, in presenza di livelli ridotti di ossigeno ($pO_2 < 10$ mmHg) il processo di riduzione di 18F-FMISO continua lentamente; con conseguente produzione progressiva di composti R-NHOH che si legano covalentemente alle molecole intracellulari, e determinano l'intrappolamento del tracciante all'interno della cellula [40-42].

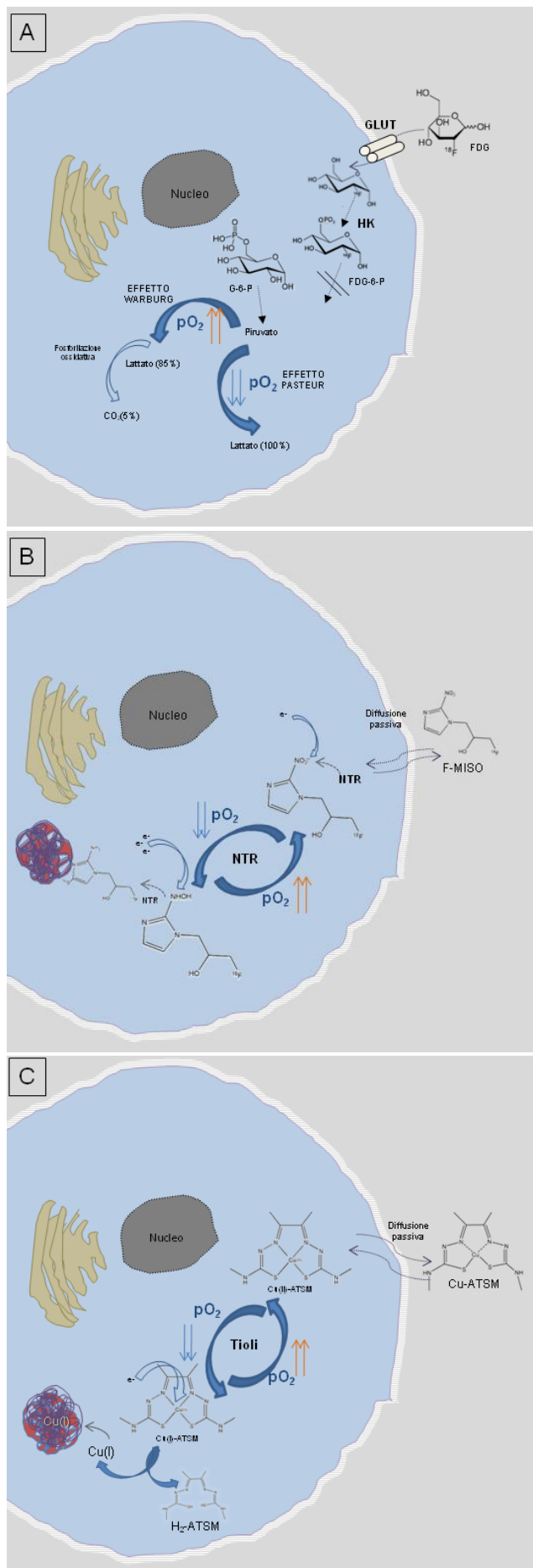


Figura 2: Raffigurazione dei meccanismi di assorbimento e di ritenzione dei principali traccianti PET, nello specifico del ^{18}F -FDG (A), ^{18}F -MISO (B), e ^{64}Cu -ATSM (C), nelle cellule viventi in condizioni di ipossia. Per il ^{18}F -FDG si nota un'ampia sovrapposizione tra l'assorbimento cellulare in normossia (effetto Warburg) e quello in condizioni di ipossia (effetto Pasteur). Per gli altri due traccianti, dopo diffusione passiva attraverso la membrana cellulare, il radiofarmaco viene trattenuto in funzione della tensione di ossigeno (pO_2) presente nell'ambiente intracellulare: in presenza di una ridotta pO_2 , il ^{18}F -MISO subisce una riduzione progressiva da parte dell'enzima nitroreduttasi (NTR) (B). Invece il Cu(II) -ATSM è ridotto a rame (I) mediante i tioli intracellulari, rendendo il complesso Cu-ATSM meno stabile. Entrambi i processi sono reversibili in presenza di una sufficiente pO_2 , e le molecole (F-MISO e Cu(II) -ATSM) sono libere di lasciare la cellula. Al contrario, in condizioni di ipossia, il complesso Cu(I) -ATSM viene progressivamente dissociato, con la formazione di $\text{H}_2\text{-ATSM}$ e Cu(I) libero, che è rapidamente incorporato nelle proteine intracellulari. Al contrario, la molecola F-MISO è legata covalentemente alle proteine intracellulari. Adattato in Italiano da Lopci et al. Am J Nucl Med Mol Imaging 2014;4(4):365-84 [21].

Abbreviazioni: GLUT = trasportatore di glucosio; HK = esochinasi; G-6-P = glucosio-6-fosfato).

Tabella 2: Riassunto dei principali traccianti PET per la valutazione dell'ipossia tumorale.

Adattato in Italiano da Lopci et al. Am J Nucl Med Mol Imaging 2014;4(4):365-84 [21]

Meccanismo	Tracciante	Tumori studiati	Vantaggi	Limitazioni
Effetto Pasteur (glicolisi anaerobica)	18F-FDG (18F-fluorodeossiglucosio)	Tumore polmonare non a piccolo cellule (NSCLC) Tumori del testa-collo Carcinoma gastrico	Buona correlazione con l'aggressività tumorale e la prognosi. Alta riproducibilità e ampia diffusione sul territorio.	Marcata sovrapposizione tra l'accumulo in cellule tumorali normossiche (effetto Warburg) e quelle ipossiche.
	18F-MISO (18F-fluoromisonidazolo)	Tumori del testa-collo Glioblastoma Carcinoma mammario NSCLC Carcinoma a cellule renali	La più ampia evidenza scientifica come tracciante per l'ipossia. Buona correlazione con la determinazione all'immunoistochimica (IHC) dell'ipossia e con la prognosi tumorale. Ampia disponibilità	Correlazione non presente in tutti i tipi tumorali. Ratio di captazione tumore-fondo basso. Riproducibilità variabile.
Accumulo del tipo nitroimidazole-like: riduzione in radicali RNO₂ e RNHOH dell'in condizioni ipossiche. Poi legame covalente con le macromolecole intracellulari	18F-FAZA (18F-fluoroazomicinarabinozide)	Tumori del testa-collo Carcinoma della cervice Carcinoma prostatico NSCLC Carcinoma rettale	Buona correlazione con la determinazione all'immunoistochimica (IHC) dell'ipossia e con la prognosi tumorale. Biodistribuzione e clearance del tracciante migliore rispetto al 18F-MISO. Ratio di captazione tumore-fondo migliore di ¹⁸ F-MISO.	Evidenza più limitata rispetto al 18F-MISO.
	18F-FETNIM (18F-fluoroeritronitroimidazolo)	NSCLC Carcinoma esofageo	Tracciante promettente con buona correlazione prognostica. Ratio di captazione tumore-fondo migliore di ¹⁸ F-MISO.	Evidenza limitata rispetto al 18F-MISO.
	18F-EF5 (18F-2-nitroimidazolo-pentafluoropropil acetamide)	Tumori cerebrali Sarcomi dei tessuti molli Tumori del testa-collo	Tracciante promettente con buona correlazione prognostica	Evidenza limitata
	18F-EF3 (18F-2-nitroimidazolo-trifluoropropil acetamide)	Modelli animani di rhabdomyosarcoma Tumori del testa-collo	Tracciante promettente	Evidenza molto limitata e prevalentemente preclinica
	18F-FETA (18F-fluoroetanidazolo)	Modelli animali MCF-7, RIF-1, EMT6, HT1080/26.6, e HT1080/1-3C	Tracciante promettente con migliore biodistribuzione rispetto a 18F-MISO.	Evidenza preclinica
	124I-IAZG (124I-iodoazomicina galattopiranoside)	Carcinoma epatocellulare (HCC)	Tracciante promettente	Evidenza preclinica
	Analoghi del nitroimidazolo marcati con Gallio-68 (68Ga-NOTA-nitroimidazolo, 68Ga-DOTA-nitroimidazolo, 68Ga-SCN-NOTA-nitroimidazolo)	Modelli animali	Tracciante promettente	Evidenza preclinica

Reduzione del complesso Cu(II)-ATSM in Cu(I)-ATSM e successiva dissociazione del Cu(I) in condizioni ipossiche. Poi legame del Cu(I) alle proteine intracellulari	60,61,62,64Cu-ATSM (60,61,62,64Cu-diacetil-bis(N4-metiliosemicarbazone)	NSCLC Tumori del testa-collo Carcinoma cervicale Carcinoma rettale Tumori cerebrali	Buona correlazione con la determinazione all'immunoistochimica (IHC) dell'ipossia e con la prognosi tumorale. Accumulo precoce del tracciante nelle aree ipossiche con elevato ratio di captazione tumore-fondo. Possibilità di acquisire immagini tardive e di utilizzare il nuclide a scopo teranostico (terapia radio metabolica con ⁶⁴ Cu-ATSM)	Evidenza più limitata rispetto al 18F-MISO. Il meccanismo di accumulo non completamente definito.
Riconosce l'anidrasi carbonica IX (CA IX)	124I-cG250 (124I-mAb G250 chimerico)	Carcinoma a cellule renali	Tracciante promettente	Evidenza preclinica
	89Zr-cG250-F(ab')2 (89Zr-chimerico G250 F(ab')2)	Tumori del testa-collo	Tracciante promettente	Evidenza preclinica

La quantità di 18F-FMISO accumulato è quindi influenzata dal livello di O₂ nel tessuto tumorale, come confermato dalla correlazione osservata tra l'assorbimento del tracciante e la pO₂ valutata alla polarografia [35, 36] o la determinazione immunoistochimica di ipossia [43, 44]. Tuttavia, la durata temporale dei processi sopra menzionati è piuttosto lunga per un tracciante marcato con il fluoro-18 (T_{1/2} 109 min), in quanto la ritenzione selettiva di 18F-FMISO nel tessuto ipossico richiede un periodo di assorbimento di circa 2-4 h dopo l'iniezione endovenosa [9, 45,46]. Inoltre, nonostante questo periodo di assorbimento, l'accumulo del tracciante rimane basso, come documentato dal ridotto rapporto tumore-plasma o tumore-muscolo di 1.2-1.4, utilizzato come cut-off ottimale per la definizione dell'ipossia [15, 45]. Questi aspetti rappresentano le principali limitazioni di 18F-FMISO e possono influenzare negativamente l'applicabilità del tracciante nella pratica clinica. Per superare il problema, Thorwarth et al. [47, 48] ha provato un approccio dinamico, senza però ottenere grossi miglioramenti.

L'ipossia con 18F-FMISO è stata valutata in numerosi tumori solidi, tra cui i gliomi [49-52], il carcinoma del testa-collo [45, 53-56], il NSCLC [36, 57], i tumori della mammella [58], e il carcinoma renale [60] (**tabella 2**). Nei pazienti con tumori cerebrali, per esempio, Hirata et al. [51] sostiene il ruolo della 18F-FMISO PET nel differenziare il glioblastoma (GBM) da altri gliomi maligni con minore espressione di ipossia tumorale. Inoltre, Swanson et al. [60] riporta una buona correlazione tra il volume ipossico determinato con la 18F-FMISO PET e la massa tumorale definita alla RMN, con particolare interesse per le sequenze T1 pesate dopo somministrazione di gadolinio (T1Gd). I dati confermano che il

processo angiogenetico è stimolato dall'ipossia nel GBM e indirettamente anticipa l'associazione tra l'aggressività del tumore visualizzata come interruzione della barriera emato-encefalica sulle sequenze T1Gd e l'ipossia raffigurato con la 18F-FMISO PET [61]. In altri studio, la PET con 18F-FMISO ha dimostrato di poter discriminare la prognosi dei pazienti con GBM. Ad esempio, Spence et al. [50] hanno studiato 22 pazienti con GBM prima della biopsia o della resezione e la radioterapia (RT) e osservato come sia il volume che l'intensità di ipossia determinate alla 18F-FMISO PET prima della terapia fossero fortemente correlate con il tempo alla progressione e la sopravvivenza.

Allo stesso modo, nei pazienti con tumori del testa-collo, Rajendran et al. [54] hanno documentato un ruolo prognostico per la 18F-FMISO PET prima della terapia rispetto alla sopravvivenza globale, con il volume ipossico e il coinvolgimento linfonodale quali fattori predittivi. Rischin et al. [62] hanno dimostrato come nei pazienti trattati con chemio/radioterapia per tumori del testa-collo allo stadio III o IV, l'ipossia vista alla FMISO PET indichi un tasso più alto di fallimento loco-regionale. Anche nelle donne in post-menopausa con carcinoma mammario in stadio II-IV, Cheng et al. [58] ha analizzato il ruolo della 18F-FMISO PET prima e dopo la terapia endocrina con letrozolo. Gli autori hanno osservato una correlazione positiva tra la captazione basale di 18F-FMISO e la risposta alla terapia ($p < 0.0001$), definendo come cut-off ottimale per la previsione della progressione di malattia (88%) un rapporto tumore-fondo alle 4ore ≥ 1.2 . In questo studio, nessuna correlazione è stata riscontrata tra la captazione di 18F-FMISO e l'espressione immunoistochimica di HIF-1 α .

Un'indicazione importante per l'imaging dell'ipossia è senza dubbio la pianificazione prima della RT. E' ben noto che l'ossigenazione pretrattamento dei tessuti neoplastici influenzi la risposta alla terapia, in quanto l'efficacia del trattamento è strettamente correlata alla quantità di radicali liberi dell'ossigeno. Pertanto la dose di radiazioni necessaria per ottenere lo stesso effetto terapeutico deve essere molto più elevata per i tumori ipossici [46]. In questo contesto, Lee et al [45] hanno riportato l'impiego della 18F-FMISO PET per aumentare la dose di radiazioni alle regioni ipossiche nei carcinomi del testa-collo. Nello stesso ambito clinico, gli stessi hanno cercato di determinare la riproducibilità della PET in due momenti distinti prima della RT [63] e di valutare l'influenza sul dosaggio alla IMRT (Intensity-modulated radiotherapy) [64]. Meno affidabile appare invece l'uso della 18F-FMISO PET per la definizione dei target prima della RT nel cancro del retto [65], a causa della non specifica captazione del tracciante nei tessuti normossici e la diffusione del tracciante attraverso la parete intestinale.

In uno studio prospettico di Tachibana et al. [66], una coorte limitata di dieci pazienti è stata studiata prima e durante RT frazionata con 18F-FMISO PET, al fine di determinare le aree ipossiche intratumorali e la loro riossigenazione. Lo studio ha rivelato un'alta percentuale di riossigenazione tumorale (8/10) durante la RT, suggerendo che l'aumento della dose alle aree ipossiche viste alla PET potrebbe essere appropriato. Tuttavia, gli autori suggeriscono l'uso seriato della 18F-FMISO PET per una pianificazione adattabile dei volumi RT (*adaptive treatment*) in base alle aree ipossiche. Risultati simili sono stati riportati anche nello studio di Lee et al. [67], ma nonostante i dati promettenti nel loro primo report [45], né la presenza né l'assenza di ipossia definita alla 18F-FMISO PET durante la valutazione in corso di RT è risultata correlare con l'outcome dei pazienti.

Ancor più contraddittori sono i dati riportati per il NSCLC. Infatti sembra che ci sia una mancanza di correlazione tra l'espressione dei marcatori tumorali di ipossia e la captazione di 18F-FMISO osservata in una serie di 17 pazienti con NSCLC resecabile [68]. Gabel et al. [36] hanno inoltre trovato una mancanza di correlazione anche tra la captazione iniziale del tracciante e la risposta al trattamento nei pazienti con NSCLC, anche se una ridotta captazione di 18F-FMISO nel post-trattamento è risultata essere indicativa di un esito favorevole. Presi insieme, questi dati sollevano un punto interrogativo sull'uso di 18F-FMISO come tracciante "universale" per l'imaging dell'ipossia. Da cui la spinta allo sviluppo di altri traccianti non nitroimidazolici, come il 64Cu-diacetil-bis(N4-metiltiosemicarbazone).

CU-DIACETIL-BIS (N4-METILTIOSEMICARBAZONE) (CU-ATSM)

Il rame radioattivo (60,61,62,64Cu) marcato con il diacetil-bis(N4-metiltiosemicarbazone) (Cu-ATSM) è un radiofarmaco PET molto promettente per la valutazione dell'ipossia (**tabella 3**). Dalla sua prima applicazione per questo scopo nel 1997 [73], il composto è apparso immediatamente adatto per il rilevamento dell'ipossia nei tessuti viventi.

Il meccanismo di assorbimento non è ancora completamente chiarito, ma come Fujibayashi et al. hanno suggerito [73], la ritenzione del tracciante nelle cellule tumorali dipende principalmente dai processi di bioreduzione citosolico/microsomiali [74]. Infatti, il Cu-ATSM è una molecola lipofila, altamente permeabile attraverso la membrana cellulare che può diffondere passivamente nell'ambiente intracellulare (**Fig.1C**). Una volta all'interno

della cellula, il composto del rame bivalente, Cu(II)-ATSM, subisce una riduzione da parte dei tioli e viene convertito nel complesso Cu(I)-ATSM [75]. In condizioni di ipossia questo complesso, meno stabili rispetto alla forma bivalente, viene progressivamente dissociato in H₂-ATSM e Cu(I), che viene rapidamente intrappolata nelle proteine intracellulari [73, 76]. L'intrappolamento riflette il livello di ossigenazione dei tessuti in molti tipi di tumore [37, 77-81] e quando confrontato direttamente con il rappresentante principale della famiglia dei 2-nitroimidazolici (18F-FMISO), l'assorbimento del Cu-ATSM appare notevolmente superiore nei tessuti bersaglio rispetto alle zone non ipossiche e si verifica in tempi molto più rapidi (10-15 min contro 2-4 ore) [46, 82]. Questi dati sono stati confermati anche per altri composti nitroimidazolici [66], favorendo pertanto il Cu-ATSM rispetto a quest'ultimi in termini di qualità di immagini (**Fig.3**).

Tabella 3: Caratteristiche principali dei nuclidi radioattivi del rame utilizzati nell'imaging PET e messi a confronto con altri nuclidi emettitori di positroni [21, 40, 69-72].

Nuclide	$T_{1/2}$	Produzione	β^+ emissione (E_{media})	Altre emissioni	Range dei β^+ nel tessuto	Uso
Rame-60 (60Cu)	23.7min	Ciclotrone	93% (0.970 MeV)	γ emissione 1332 keV 88% 1791 keV 45.4%	4.4 mm	Diagnostico
Rame-61 (61Cu)	3.33ore	Ciclotrone	61% (0.500 MeV)	γ emissione 282 keV 12.20% 656 keV 10.77%	2.6 mm	Diagnostico
Rame-62 (62Cu)	9.67min	Generatore/ ciclotrone	97.83% (1.319 MeV)	γ emissione 1172 0.74%	6.6 mm	Diagnostico
Rame-64 (64Cu)	12.7ore	Ciclotrone	17.6% (0.278 MeV)	γ emissione 1345 keV 0.47% β^- emissione 0.190 MeV 38.7%	1.4 mm	Diagnostico/ terapeutico
Fluoruro-18 (18F)	109.7min	Ciclotrone	96.7% (0.249 MeV)	β^- emission (0.52 keV)	0.6 mm	Diagnostico
Iodio-124 (124I)	4.17giorni	Ciclotrone	22.7% (0.820 MeV)	γ emissione 0.602 keV 62.9% 1690.9 keV 11.15%	3 mm	Diagnostico
Gallio-68 (68Ga)	67.71min	Generatore	88.91% (0.829 MeV)	γ emissione 1077 keV 3.2%	2.9 mm	Diagnostico

Da recenti indagini, sembra plausibile che un ruolo significativo nell'intrappolamento del Cu-ATSM venga giocato dal rame stesso. Per verificare questa ipotesi, Hurting et al. [83] hanno analizzato *in vitro* ed *in vivo* la distribuzione di ^{64}Cu -ATSM e ^{64}Cu -acetato negli stessi modelli animali. Gli autori hanno mostrato una distribuzione tissutale simile del rame radioattivo per entrambi i traccianti, il che ha suggerito un ruolo rilevante del rame nel meccanismo di captazione selettiva del Cu-ATSM in condizioni di ipossia. Ciononostante, sono necessarie indagini più approfondite e prove consolidate nel contesto clinico per confermare questa ipotesi.

Il primo uso umano del Cu-ATSM risale al 2000, quando Takahashi et al. [84] hanno studiato la sua applicazione in quattro soggetti normali e in sei pazienti affetti da cancro del polmone. Il tracciante, in questo caso il ^{62}Cu -ATSM, si accumulava in pochi minuti in tutti i pazienti con cancro (rapporto tumore-sfondo di 3.0), mentre veniva eliminato rapidamente dal sangue di tutti i soggetti normali. Risultati simili sono stati documentati per gli altri radioisotopi del rame marcati con l'ATSM. Nel loro studio di fattibilità, Dehdashti et al. [37] hanno analizzato il ruolo del ^{60}Cu -ATSM in pazienti con NSCLC e correlato i risultati all'imaging PET con il follow-up (n=19), e la risposta alla terapia (n=14). Come previsto, il tracciante aveva una distribuzione variabile nelle masse tumorali, a seconda del livello di ipossia, e gli autori sono stati in grado di definire un rapporto tumore-muscolo (T/M) di 3.0 efficace nel distinguere i pazienti responsivi (*responders*) dai non responsivi (*non-responders*) al trattamento.

Lo stesso gruppo [79] ha valutato il significato prognostico del ^{60}Cu -ATSM in 14 pazienti con cancro cervicale prima della RT e della chemioterapia. Questa volta il rapporto T/M ottenuto è stato di 3.5, permettendo di distinguere in maniera ottimale i pazienti recidivati da quelli liberi da malattia nel follow-up. Risultati simili sono stati ottenuti in uno studio più recente in 38 pazienti con carcinoma cervicale [84]. In questo caso, il ^{60}Cu -ATSM prima del trattamento ha dato informazioni pertinenti sull'ossigenazione del tumore e predittivi dell'outcome del paziente. Il gruppo della Yokohama City University [77] ha studiato l'uso del ^{62}Cu -ATSM in 17 pazienti con tumore localmente avanzato del testicolo (stadio III-IV) prima della chemioterapia o della RT. In 15 casi gli autori hanno valutato la relazione tra outcome clinico e assorbimento di ^{62}Cu -ATSM. Il SUVmax nella loro analisi differiva in modo significativo ($p<0.05$) nei pazienti liberi da malattia a 2 anni di follow-up post-irradiazione rispetto a quelli con malattia residua/recidivata. In particolare, tutti i pazienti curati avevano un SUVmax<5.0 e tutti i pazienti (n=10) con malattia persistente avevano un SUVmax>5.0.

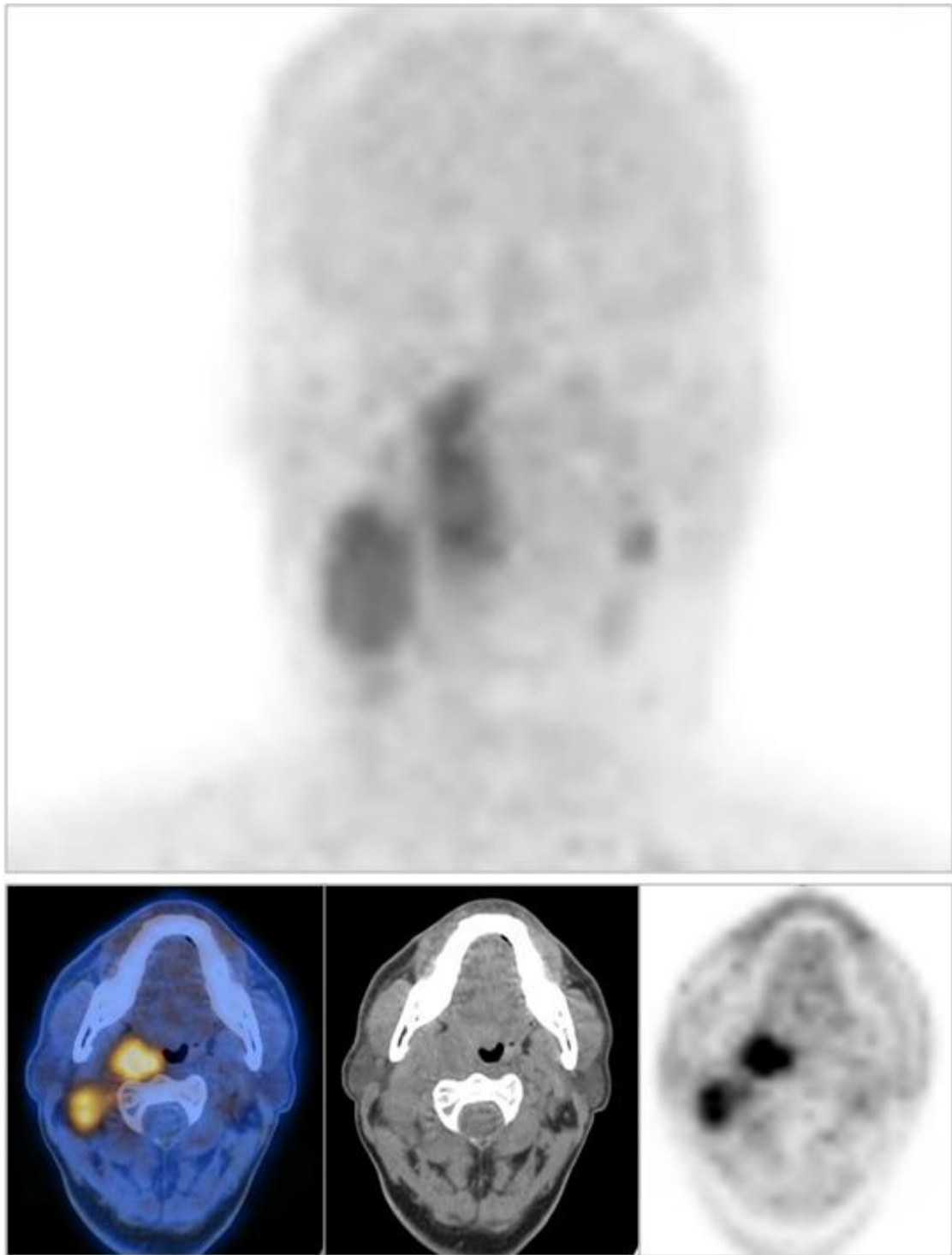


Figura 3: Esempio di un paziente con tumore del testa-collo avanzato studiato con ^{64}Cu -ATSM PET/CT prima della chemio/radioterapia combinata: nelle immagini sopra troviamo il MIP (maximum intensity projection) e le immagini assiali all'altezza della lesione tonsillare destra e delle adenopatie laterocervicali omolaterali visualizzate in ordine da destra a sinistra come: ^{64}Cu -ATSM PET, TC di localizzazione e immagini fuse PET/TC. Il paziente ha presentato malattia residua alla rivalutazione di fine trattamento.

Recentemente, il ^{62}Cu -ATSM è stato studiato in 22 pazienti con glioma [81], con l'intento di differenziare il grado tumorale secondo la captazione correlando i risultati PET con la presa di contrasto in RMN e l'espressione di HIF-1 α all'immunoistochimica. Utilizzando una soglia tumore-fondo di 1.8 a 30-40 minuti dall'iniezione, la captazione di ^{62}Cu -ATSM è risultata essere predittiva dell'espressione di HIF-1 α , con il 92,3% di sensibilità e 88,9% di specificità. Inoltre, la captazione è risultata significativamente correlata con la presenza di componente necrotica ($p=0.002$) e di captazione regionale di contrasto alla RMN nel 61.9% (13/21) dei tumori.

Tuttavia, alcuni dati preclinici suggeriscono che il Cu-ATSM possa non essere adatto per tutti i tipi di tumore. In un modello animale di fibrosarcoma (FSA) e nelle linee cellulari di cancro alla prostata (PC-3, 22Rv1, LNCaP, LAPC-4, e R3327-AT) [85-87], il tracciante ha mostrato una selettività limitata per l'ipossia, suggerendo la necessità di studi clinici specifici in questi tipi di tumori solidi. Quest'ultimo aspetto è fondamentale perché i modelli animali non corrispondono completamente al cancro umano e tendono a dare risultati discordanti in base alla linea cellulare utilizzata. Ad esempio, il modello di ratto di fibrosarcoma indagato da Jalilian et al. nel 2009 [88] con ^{61}Cu -ATSM ha dato risultati completamente diversi dai risultati di Yuan et al. [85] nel modello FSA.

Per quanto riguarda la pianificazione della RT, il vantaggio principale del Cu-ATSM è il suo elevato rapporto tumore-fondo (>3.0). Come riportato da Dalah et al. [89] nella loro simulazione per ^{64}Cu -ATSM e ^{18}F -FMISO, un buon rapporto tumore-fondo permette un'alta sensibilità e specificità nell'identificare le lesioni positive alla PET. Ciò è stato dimostrato anche nello studio di fattibilità riportato da Chao et al [135] nei tumori del testa-collo, dove l'uso del Cu-ATSM per l'IMRT ha portato ad una dose più elevata (80Gy) nelle aree ipossiche e risparmiato oltre la metà delle ghiandole parotidi a meno di 30Gy [90].

Tra i radionuclidi del rame, il ^{64}Cu rappresenta il miglior compromesso per $T_{1/2}$, risoluzione intrinseca e resa di produzione (**tabella 3**). In un confronto diretto tra ^{60}Cu -ATSM e ^{64}Cu -ATSM in dieci pazienti con carcinoma della cervice [91], per esempio, il ^{64}Cu -ATSM è risultato sicuro come il ^{60}Cu -ATSM offrendo anche il vantaggio di una migliore qualità delle immagine. Un altro vantaggio dell'utilizzo del ^{64}Cu -ATSM è il potenziale *teranostico* (terapeutico/diagnostico) del nuclide, che emette particelle beta- di energia media, insieme ai positroni, con alto trasferimento lineare di energia (LET) e elettroni Auger [92, 93]. Tale aspetto racchiude anche la debolezza principale del ^{64}Cu -ATSM, che espone a maggiore irradiazione corporea per attività diagnostiche rispetto alle stesse dosi di ^{18}F -FMISO [40, 92].

L'aspetto teranostico è stato evidenziato in alcuni studi preclinici [93, 94], ove il tracciante è riuscito a produrre un effetto tossico sulle cellule bersaglio con minimi effetti sul tessuto limitrofo. Questo effetto terapeutico è stato visto anche da Yoshii et al. [95] in un modello di carcinoma del colon (Colon-26) per somministrazioni bisettimanali di 37MBq ^{64}Cu -ATSM. Questa applicazione potenziale richiede ulteriori prove cliniche, pertanto al momento la principale applicazione del ^{64}Cu -ATSM rimane in campo diagnostico per la valutazione dell'ipossia.

BIBLIOGRAFIA

1. Vaupel P, Mayer A. Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer Metastasis Rev* 2007; 26:225–239.
2. Tomlinson RH, Gray LH. The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy. *Br J Cancer* 1955;9:539–49.
3. Mees G, Dierckx R, Vangestel C, Van de Wiele C. Molecular imaging of hypoxia with radiolabelled agents. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2009; 36:1674–1686.
4. Albiach CF, Moreno AC, Cordon MR, Morillo Macías V, Bouché Babiloni A, Beato Tortajada I, Sánchez Iglesias A, Francés Muñoz A. Contribution of hypoxia-measuring molecular imaging techniques to radiotherapy planning and treatment. *Clin Transl Oncol* 2010; 12:22-26.
5. Rajendran JG, Hendrickson K, Spence A, Muzi M, Krohn KA, Mankoff DA. Hypoxia imaging directed radiation treatment planning. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2006;33 (Suppl1):44-53.
6. Vaupel P, Harrison L. Tumor hypoxia: causative factors, compensatory mechanisms, and cellular response. *Oncologist* 2004;9(Suppl 5):4–9.
7. Krause BJ, Beck R, Souvatzoglou M, Piert M. PET and PET/CT studies of tumor tissue oxygenation. *Q J Nucl Med Mol Imaging* 2006; 50:28-43.
8. Hoeckel M, Knoop C, Schlenger K, Vorndran B, Baussmann E, Mitze M, Knapstein PG, Vaupel P. Intratumoral pO₂ predicts survival in advanced cancer of the uterine cervix. *Radiother Oncol* Jan;1993 26(1):45–50.
9. Padhani AR. Where are we with imaging oxygenation in human tumors? *Cancer Imaging* 2005; 5:128-130.
10. Hockel M, Vaupel P. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93: 266–76.

11. Evans SM, Koch CJ. Prognostic significance of tumor oxygenation in humans. *Cancer Lett* 2003; 195: 1-16.
12. Post DE, Van Meir EG. Generation of bidirectional hypoxia/HIF-responsive expression vectors to target gene expression to hypoxic cells. *Gene Ther* 2001; 8:1801-1807.
13. Anderson CJ, Ferdani R. Copper-64 radiopharmaceuticals for PET imaging of cancer: advances in preclinical and clinical research. *Cancer Biother Radiopharm* 2009; 24: 379-393.
14. Vikram DS, Zweier JL, Kuppusamy P. Methods for noninvasive imaging of tissue hypoxia. *Antioxidant Redox Signal* 2007; 9: 1745-1756.
15. Lapi SE, Voller TF, Welch MJ. Positron Emission Tomography Imaging of Hypoxia. *PET Clin* 2009; 4:39-47.
16. Wang W, Lee NY, Georgi J, Narayanan M, Guillem J, Schöder H, Humm JL. Pharmacokinetic analysis of hypoxia 18F-fluoromisonidazole dynamic PET in head and neck cancer. *J Nucl Med* 2010; 51: 37-45.
17. Price JM, Robinson SP, Koh DM. Imaging hypoxia in tumours with advanced MRI. *Q J Nucl Med Mol Imaging* 2013; 57:257-70.
18. Krohn KA, Link JM, Mason RP. Molecular Imaging of Hypoxia. *J Nucl Med* 2008; 49: 129S-148S.
19. Egeland TAM, Gulliksrud K, Gaustad JV, Mathiesen B, Rofstad EK. Dynamic contrast-enhanced-MRI of tumor hypoxia. *Magn Reson Med* 2012; 67:519-530.
20. Manzoor AA, Yuan H, Palmer GM, Viglianti BL, Dewhirst MW. Imaging Hypoxia. *Molecular Imaging: Principles and Practice*. Edited by Weissleder R, Ross BD, Rehemtulla A, Gambhir SS. Shelton, PMPH-USA, 2010, pp756-779.
21. Lopci E, Grassi I, Chiti A, et al. PET radiopharmaceuticals for imaging of tumor hypoxia: a review of the evidence. *Am J Nucl Med Mol Imaging* 2014;4:365-84.
22. Chapman JD, Franko AJ, Sharplin J. A Marker for Hypoxic Cells in Tumors with Potential Clinical Applicability. *British Journal of Cancer* 1981;43:546–50.
23. Dierckx RA, Van de Wiele. FDG uptake, a surrogate of tumour hypoxia? *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2008; 35(8): 1544-9.
24. Van Baardwijk A, Doms C, van Suylen RJ, Verbeken E, Hochstenbag M, Dehing-Oberije C, Rupa D, Pastorekova S, Stroobants S, Buell U, Lambin P, Vansteenkiste J, De Ruyscher D. The maximum uptake of (18)F-deoxyglucose on positron emission tomography scan correlated with survival, hypoxia inducible factor-1alpha and GLUT-1 in non-small cell lung cancer. *Eur J Cancer* 2007; 43:1392-8.

25. Clavo AC, Brown RS, Wahl RL. Fluorodeoxyglucose uptake in human cancer cell lines is increase by hypoxia. *J Nucl Med* 1995; 36:1625-32.
26. Busk M, Horsman MR, Kristjansen PEG, van der Kogel AJ, van der Kogel AJ, Bussink J, Overgaard J. Aerobic glycolysis in cancer: implications for the usability of oxygen-responsive genes and fluorodeoxyglucose-PET as markers of tissue hypoxia. *Int J Cancer* 2008; 122: 2726-2734.
27. Warburg O. On respiratory impairment in cancer cells. *Science* 1956;124:269–70.
28. Kaira K, Okumura T, Ohde Y, Takahashi T, Murakami H, Oriuchi N, Endo M, Kondo H, Nakajima T, Yamamoto N. Correlation between 18F-FDG uptake on PET and molecular biology in metastatic pulmonary tumors. *J Nucl Med* 2011; 52: 705-11.
29. Airley RE, Mobasher A. Hypoxic regulation of glucose transport, anaerobic metabolism and angiogenesis in cancer: novel pathways and targets for anticancer therapeutics. *Chemotherapy* 2007; 53: 233-56.
30. Kim JW, Gao P, Dang CV. Effects of hypoxia on tumor metabolism. *Cancer Metastasis Rev.* 2007; 26: 291-8.
31. Christian N, Deheneffe S, Bol A, DeBast M, Labar D, Lee JA, Gregoire V. Is 18F-FDG a surrogate tracer to measure tumor hypoxia? Comparison with the hypoxic tracer 14C-EF3 in animal tumor models. *Radiother Oncol* 2010; 97:183-8.
32. Takebayashi R, Izuichi K, Yamamoto Y, Kameyama R, Mori H, Masaki T, Suzuki Y. [18F]fluorodeoxyglucose accumulation as a biological marker of hypoxic status but not glucose transport ability in gastric cancer. *J Exp Clin Can Res* 2013; 32:34.
33. Han MW, Lee HJ, Cho KJ, Kim JS, Roh JL, Choi SH, Nam SY, Kim SY. Role of FDG-pet as a biological marker for predictiong the hypoxic status of tongue cancer. *Head Neck* 2012; 34:1395-1402.
34. Zimny M, Gagel B, DiMartino E, Hamacher K, Coenen H, Westhofen M, Eble M, Buell U, Reinartz P. FDG—a marker of tumour hypoxia? A comparison with [(18)F]fluoromisonidazole and pO₂-polarography in metastatic head and neck cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2006;33:1426–31.
35. Gabel B, Reinartz P, Demirel C, Kaiser HJ, Zimny M, Piroth M, Pinkawa M, Stanzel S, Asadpour B, Hamacher K, Coenen HH, Buell U, Eble MJ. [18F]fluoromisonidazole and [18F]fluorodeoxyglucose positron emission tomography in response evaluation after chem./radiotherapy of non-small-cell lung cancer: a feasibility study. *BMC cancer* 2006; 6:51.

36. Gabel B, Reinartz P, DiMartino E, Zimny M, Pinkawa M, Maneschi P, Stanzel S, Hamacher K, Coenen HH, Westhofen M, Bull U, Eble MJ. pO₂ Polarography Versus Positron Emission Tomography ([¹⁸F]Fluoromisonidazole, [¹⁸F]-2-Fluoro-2'-Deoxyglucose). *Strahlenther Onkol* 2004; 180:616-22.
37. Dehdashti F, Mintun MA, Lewis JS, Bradley J, Govidan R, Laforest R, Welch MJ, Siegel BA. In vivo assessment of tumor hypoxia in lung cancer with ⁶⁰Cu-ATSM. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2003; 30:844-50.
38. Jerabek PA, Patrick TB, Kilbourn MR, Dischino DD, Welch MJ. Synthesis and biodistribution of of ¹⁸F-labeled fluoronitroimidazoles: potential in vivo markers of hypoxic tissue. *Int J Radiat Appl Instrum Part A* 1986; 37:599-605.
39. Grierson JR, Link JM, Mathis CA, Rasey JS, Krohn KA. Radiosynthesis of fluorine-18 fluoromisonidazole. *J Nucl Med* 1989;30:343–50.
40. Bourgeois M, Rajerison H, Guerard F, Mougin-Degraef M, Barbet J, Michel N, Cherel M, Faivre-Chauvet A. Contribution of [⁶⁴Cu]-ATSM PET in molecular imaging of tumour hypoxia compared to classical [¹⁸F]-MISO--a selected review. *Nucl Med Rev Cent East Eur*. 2011;14(2):90-5. Review.
41. Hoigebazar L, Jeong JM. Hypoxia imaging agents labeled with positron emitters. *Recent Results cancer Res* 2013; 194:285:99.
42. Takasawa M, Moustafa RR, Baron JC. Applications of Nitromidazole in vito hypoxia imaging in ischemic stroke. *Stroke* 2008; 39: 1629-37.
43. Troost EGC, Laverman P, Kaanders JHAM, Philippens M, Lok J, Oyen WJG, van der Kogel, Boermann OC, Bussink J. Imaging hypoxia after oxygenation modification: comparing [¹⁸F]FMISO autoradiography with pimonidazole immunohistochemistry in human xenograft tumors. *Radiother Oncol* 2006;80:157–64.
44. Troost EGC, Laverman P, Philippens MEP, Lok J, van der Kogel AJ, OyenWJG, Boerman OC, Kaanders JH, Bussink J. Correlation of [¹⁸F]FMISO autoradiography and pimonidazole immunohistochemistry in human head and neck carcinoma xenografts. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2008;35: 1803–11.
45. Lee NY, Mechalakos JG, Nehmeh S, Lin Z, Squire OD, Cai S, Chan K, Zanzonico PB, Greco C, Ling CC, Humm JL, Schöder H. Fluorine-18-labeled fluoromisonidazole positron emission and computed tomography-guided intensity-modulated radiotherapy for head and neck cancer: a feasibility study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2008; 70:2-13.

46. Arabi M, Piert M. Hypoxia PET/CT imaging: implications for radiation oncology. *Q J Nucl Med Mol Imaging* 2010; 54:500-9.
47. Thorwarth D, Alber M. Implementation of hypoxia imaging into treatment planning and delivery. *Radiother Oncol.* 2010;97:172–175.
48. Carlin S, Zhang H, Reese M, Ramos NN, Chen Q, Ricketts SA. A comparison of the imaging characteristics and microregional distribution of 4 hypoxia PET tracers. *J Nucl Med* 2014; Feb 3 [Epub ahead of print].
49. Cher L, Murone C, Lawrentschuk N, Ramdave S, Papenfusse A, Hannah A, O'keefe GJ, Sachinidis JL, Berlangieri SU, Fabinyi G, Scott AM. Correlation of hypoxic cell fraction and angiogenesis with glucose metabolic rate in gliomas using 18F-fluoromisonidazole, 18F-FDG PET, and immunohistochemical studies. *J Nucl Med* 2006;47:410–18.
50. Spence AM, Muzi M, Swanson KR, O'Sullivan F, Rockhill JK, Rajendran JG, Adamsen TC, Link JM, Swanson PE, Yagle KJ, Rostomily RC, Silbergeld DL, Krohn KA. Regional hypoxia in glioblastoma multiforme quantified with [18F]fluoromisonidazole positron emission tomography before radiotherapy: correlation with time to progression and survival. *Clin Cancer Res* May 1;2008 14:2623–30.
51. Hirata K, Terasaka SH, Shiga T, Hattori N, Magota K, Kobayashi H, Yamaguchi S, Houkin K, Tanaka S, Kuge Y, Tamaki N. 18F-Fluoromisonidazole positron emission tomography may differentiate glioblastoma multiforme from less malignant gliomas. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2012; 39:760-770.
52. Valk PE, Mathis CA, Prados MD, Gilbert JC, Budinger TF. Hypoxia in human gliomas: demonstration by PET with fluorine-18-fluoromisonidazole. *J Nucl Med* 1992;33:2133–7.
53. Eschmann SM, Paulsen F, Reimold M, Dittmann H, Welz S, Reischl G, Machulla HJ, Bares R. Prognostic impact of hypoxia imaging with 18F-misonidazole PET in non-small cell lung cancer and head and neck cancer before radiotherapy. *J Nucl Med* 2005;46:253-60.
54. Rajendran JG, Schwartz DL, O'Sullivan J, Peterson LM, Ng P, Scharnhorst J, Grierson JR, Krohn KA. Tumor hypoxia imaging with [F-18] Fluoromisonidazole positron emission tomography in head and neck cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12:5435-41.
55. Kikuchi M, Yamane T, Shinohara Sh, Fujiwara K, Hori SY, Tona Y, Yamazaki H, Naito Y, Senda M. 18F-fluoromisonidazole positron emission tomography before treatment

- is a predictor of radiotherapy outcome and survival prognosis in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Ann Nucl Med* 2011; 25:625-633.
56. Zips D, Zoephel K, Abolmaali N, Perrin R, Abramyuk A, Haase R, Appold S, Steinbach J, Kotzerke J, Baumann M. Exploratory prospective trial of hypoxia-specific PET imaging during radiochemotherapy in patients with locally advanced head-and-neck cancer. *Radiother Oncol* 2012; 105:21-28.
57. Rasey JS, Koh WJ, Evans ML, Peterson LM, Lewellen TK, Graham MM, Krohn KA. Quantifying regional hypoxia in human tumors with positron emission tomography of [18F]fluoromisonidazole: a pretherapy study of 37 patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1996;36:417–428.
58. Cheng J, Lei L, Xu J, Sun Y, Zhang Y, Wang X, Pan L, Shao ZH, Zhang Y, Liu G. 18F-Fluoromisonidazole PET/CT: a potential tool for predicting primary endocrine therapy resistance in breast cancer. *J Nucl Med* 2013; 54:333-40.
59. Lawrentschuk N, Poon AMT, Foo SS, Jonhs LG, Putra J, Murone C, Davis ID, Bolton DM, Scott AM. Assessing regional hypoxia in human renal tumours using 18F-fluoromisonidazole positron emission tomography. *BJU International* 2005; 96:540-546.
60. Swanson KR, Chakraborty G, Wang CH, Rockne R, Harpold HLP, Muzi M, Adamsen TCH, Kenneth AK, Spence AM. Complementary but distinct role for MRI and 18F-fluoromisonidazole PET in the assessment of human glioblastomas. *J Nucl Med* 2009; 50:36-44.
61. Kawai N, Maeda Y, Kudomi N, Miyake K, Okada M, Yamamoto Y, Nishiyama Y, Tamiya T. Correlation of biological aggressiveness assessed by 11C-methionine PET and hypoxic burden assessed by 18F-fluoromisonidazole PET in newly diagnosed glioblastoma. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2011; 38:441-450.
62. Rischin D, Hicks RJ, Fisher R; Binns D, Corry J, Porceddu S, Peters LJ. Prognostic significance of [18F]-misonidazole positron emission tomography-detected tumor hypoxia in patients with advanced head and neck cancer randomly assigned to chemoradiation with or without tirapazamine: a substudy of Trans-Tasman Radiation Oncology Group Study 98.02. *J Clin Oncol* 2006; 24:2098-104.
63. Nehmeh SA, Schoder H, Lee NY, Squire O, Zanzonico PB, Erdi YE, Greco C, Mageras G, Pham HS, Larson SM, Ling CC, Humm JL. Reproducibility of the intra-tumoral distribution of 18F-fluoromisonidazole (18FMISO) in head and neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2008;70:235–242.

64. Lin ZH, Mechalakos J, Nehmeh S, Schoder H, Lee Nancy, Humm J, Ling Clifton. The influence of changes in tumor hypoxia on dose-painting treatment plans based on 18F-FMISO positron emission tomography. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* 2008; 70: 1219-28.
65. Roels S, Slagmolen P, Nuyts J, Lee JA, Loeckx D, Maes F, Stroobants S, Penninckx F, Haustermans K. Biological image-guided radiotherapy in rectal cancer: is there a role for FMISO or FLT, next to FDG? *Acta Oncol* 2008; 48:1237-48.
66. Tachibana I, Nishimura Y, Shibata T, Kanamori S, Nakamatsu K, Koike R, Nishikawa T, Ishikawa K, Tamura M, Hosono M. A prospective clinical trial of tumor hypoxia imaging with 18F-fluoromisonidazole positron emission tomography and computed tomography (F-MISO PET/CT) before and during radiation therapy. *J Radiat Res* 2013; 54: 1078-84.
67. Lee N, Nehmeh S, Schoder H, Fury M, Chan K, Ling C, Humm J. Prospective trial incorporating pre-/mid-treatment [18F]-misonidazole positron emission tomography for head-and-neck cancer patients undergoing concurrent chemoradiotherapy. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* 2009; 75: 101-8.
68. Cherk MH, Foo SS, Poon AMT, Knight SR, Murone C, Papenfuss AT, Sachinidis JI, Saunder THC, O'Keefe GJ, Scott AM. Lack of correlation of hypoxic cell fraction and angiogenesis with glucose metabolic rate in non-small cell lung cancer assessed by 18F-Fluoromisonidazole and 18F-FDG PET. *J Nucl Med* 2006; 47:1921-1926.
69. McCarthy DW, Bass LA, Cutler PD, Shefer RE, Klinkowstein RE, Herrero P, Lewis JS, Cutler CS, Anderson CJ, Welch MJ. High purity production and potential applications of copper-60 and copper-61. *Nucl Med Biol* 1999; 26: 351–358.
70. <http://www.nndc.bnl.gov/nudat2/> NuDat 2 is a software product that allows to search and plot nuclear structure and nuclear decay data interactively. NuDat 2 was developed by the National Nuclear Data Center (NNDC) in Brookhaven National Laboratory.
71. Partridge M, Spinelli, A, Rydera W, Hindorfa C. The effect of β^+ energy on performance of a small animal PET camera. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment*. 2006; 568(2):933–6.
72. Philip J. Blower, Jason S. Lewis, Jamal Zweit. Copper radionuclides and radiopharmaceuticals in nuclear medicine. *Nuclear Medicine and Biology* 1996; 23 (8):927-1025.

73. Fujibayashi Y, Taniuchi H, Yonekura Y, Ohtani H, Konishi J, Yokoyama A. Copper-62-ATSM: A new hypoxia imaging agent with high membrane permeability and low redox potential. *J Nucl Med*;1997 38:1155–60.
74. Hustinx R, Eck SL, Alavi A. Potential Applications of PET Imaging in Developing Novel Cancer Therapies. *J Nucl Med* 1999; 40:995-1002.
75. Chen K, Che X. Positron Emission Tomography Imaging of Cancer Biology: Current Status and Future Prospects. *Semin Oncol* 2011; 38(1): 70-86.
76. Dealing JLJ, Lewis JS; McCarthy DW, Welch MJ, Blower PJ. Redox-active metal complexes for imaging hypoxic tissues: structure-activity relationships in copper(II)bis(thiosemicarbazone) complexes. *Chem Commun (Camb)*1998; 22:2531-2.
77. Minagawa Y, Shizukuishi K, Koike I, Horiuchi C, Watanuki K, Hata M, Omura M, Odagiri K, Tohnai I, Inoue T, Tateishi U. Assessment of tumor hypoxia by ⁶²Cu-ATSM PET/CT as a predictor of response in head and neck cancer: a pilot study. *Ann Nucl Med* 2011; 25:339-345.
78. Grassi I, Nanni C, Cicoria G, Blasi C, Bunkheila F, Lopci E, Colletti PM, Bubello D, Fanti S. Usefulness of ⁶⁴Cu-ATSM in Head and Neck Cancer: A preliminary Prospective Study. *Clin Nucl Med* 2013; Oct 3 [Epub ahead of print].
79. Dehdashti F, Grigsby PW, Mintun MA, Lewis JS, Siegel BA, Welch MJ. Assessing tumor hypoxia in cervical cancer by positron emission tomography with ⁶⁰Cu-ATSM: relationship to therapeutic response – a preliminary report. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* 2003; 1233-38.
80. Dietz DW, Dehdashti F, Grigsby PW, Malyapa RS, Myerson RJ, Picus J, Ritter J, Lewis JS, Welch MJ, Siegel BA. Tumor hypoxia detected by positron emission tomography with ⁶⁰Cu-ATSM as a predictor of response and survival in patients undergoing Neoadjuvant chemoradiotherapy for rectal carcinoma: a pilot study. *Dis Colon Rectum* 2008; 51(11);1641:8.
81. Tateichi K, Tateishi U, Sato M, Yamanaka S, Kanno H, Murata H, Inoue T, Kawahara N. Application of ⁶²Cu-diacetyl-bis (N4-methylthiosemicarbazone) PET imaging to predict highly malignant tumor grades and hypoxia-inducible factor-1a expression in patients with glioma. *AJNR Am J Neuroradiol* 2013; 34(1):92-9.
82. Lewis JS, McCarthy DW, McCarthy TJ, Fujibayashi Y, Welch MJ. Evaluation of ⁶⁴Cu-ATSM in vitro and in vivo in hypoxic tumor model. *J Nucl Med* 1999; 40:177-83.

83. Hueting R, Kersemans V, Cornelissen B, Tredwell M, Hussein K, Christlieb M, Gee AD, Passchier J, Smart SC, Dilworth JR, Gouverneur V, Muschel RJ. A comparison of the behavior of ^{64}Cu -Acetate and ^{64}Cu -ATSM in vitro and in vivo. *J Nucl Med* 2014; 55:128-34.
84. Takahashi N, Fujibayashi Y, Yonekura Y, Welch MJ, Waki A, Tsuchida T, Sadato N, Sugimoto K, Itoh H. Evaluation of ^{62}Cu labeled diacetyl-bis(N4-methylthiosemicarbazone) as a hypoxic tissue tracer in patients with lung cancer. *Ann Nucl Med* Oct;2000;14:323–8.
85. Yuan H, Schroeder Th, Bowsher JE, Hedlund LW, Wong T, Dewhirst MW. Intertumoral differences in hypoxia selectivity of the PET imaging agent $^{64}\text{Cu}(\text{II})$ -diacetyl-bis(N4-methylthiosemicarbazone). *J Nucl Med* 2006; 47:989-98.
86. Vavere AL, Lewis JS. Examining the relationship between Cu-ATSM hypoxia selectivity and fatty acid synthase expression in human prostate cancer cell lines. *Nucl Med Biol* 2008; 35:273-279.
87. O'Donoghue J, Zanzonico P, Pugachev A, Wen B, Smith-Jones P, Cai Sh, Burnazi E, Finn R, Burgman P, Ruan Sh, Lewis JS, Welch MJ, Ling CC, Humm JL. Comparative study featuring microPET imaging, Po_2 probe measurement, autoradiography, and fluorescent microscopy in the R3327-AT and FaDu rat tumor models. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005; 61:1493-1502.
88. Jalilian AR, Rostampour N, Rowshanfarzad P, Shafaii K, Kamali-Dehghan M, Akhlaghi M. Preclinical studies of ^{61}Cu ATSM as a PET radiopharmaceutical for fibrosarcoma imaging. *Acta Pharm* 2009;59:45-55.
89. Dalah E, Bradley D, Nisbet A. Simulation of tissue activity curves of ^{64}Cu -ATSM for sub-target volume delineation in radiotherapy. *Phys Med Biol* 2010; 55:681-694.
90. Grosu AL, Souvatzoglou M, Roper B, Dobritz M, Wiedenmann N, Jacob V, Wester HJ, Reischl G, Machulla HJ, Schwaiger M, Molls M, Pierr M. Hypoxia imaging with FAZA-PET and theoretical considerations with regard to dose painting for individualization of radiotherapy in patients with head and neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2007; 69:541-551.
91. Lewis JS, Laforest R, Dehdashti F, Grigsby PW, Welch MJ, Siegel BA. An Imaging comparison of ^{64}Cu -ATSM and ^{60}Cu -ATSM in cancer of uterine cervix. *J Nucl Med* 2008; 49:1177-82.
92. Laforest R, Dehdashti F, Lewis JS, Schwarz SW. Dosimetry of $^{60}/^{61}/^{62}/^{64}\text{Cu}$ -ATSM: a hypoxia imaging agent for PET. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2005;32:764–70.

93. Weeks AJ, Paul RL, Marsden PK, Blower PJ, Lloyd DR. Radiobiological effects of hypoxia-dependent uptake of ^{64}Cu -ATSM: enhanced DNA damage and cytotoxicity in hypoxic cells. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2010; 37:330-8.
94. Lewis J, Laforest R, Buettner T, Song S, Fujibayashi Y, Connett J, Welch M. Copper-64-diacetyl-bis(N4-methylthiosemicarbazone): an agent for radiotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:1206–11.
95. Yoshii Y, Furukawa T, Kiyono Y, Watanabe R, Mori T, Yoshii H, Asai T, Okazawa H, Welch MJ, Fujibayashi Y. Internal radiotherapy with copper-64-diacetyl-bis(N4-methylthiosemicarbazone) reduces CD133+ highly tumorigenic cells and metastatic ability of mouse colon carcinoma. *Nucl Med Biol* 2011;38:151-57.

CORRELAZIONE TRA I MARKATORI TISSUTALI D'IPOSSIA E LA PET CON FDG

NOTE: Ai fini del progetto di ricerca afferente al dottorato in Scienze Mediche Specialistiche del XXVIII ciclo, il contenuto della presente sessione è stato presentato come comunicazione orale (**OP146:** Lopci et al. *Correlation of metabolic information on PET/CT and tissue expression of HIF1a and CD68+ macrophages in surgically treated NSCLC.*) all'ultimo congresso annuale EANM (European Association of Nuclear Medicine) svoltosi a Amburgo nell'Ottobre 2015.

ABSTRACT: Correlazione tra le informazioni metaboliche alla PET/TC con l'espressione tissutale di HIF-1 α e l'infiltrato tumorale di macrofagi CD68+ nei pazienti affetti da NSCLC trattati chirurgicamente

Scopo dello studio: E' ampiamente riconosciuto che l'ipossia tumorale influenzi negativamente l'efficacia della terapia in diversi tipi tumorali, incluso in primis il tumore polmonare non a piccole cellule (NSCLC). Lo scopo del presente studio è quello di indagare il ruolo dei parametri identificati alla PET/TC nei pazienti con NSCLC trattati chirurgicamente, confrontando i risultati dell'imaging con l'espressione tissutale di HIF-1 α e dell'infiltrato tumorale di macrofagi CD68+.

Materiali e Metodi: Una serie di 29 pazienti affetti da NSCLC (stadio IA-IIIa; M: F = 22:7) e indagati con FDG PET/TC prima dell'intervento chirurgico, è stata consecutivamente analizzata per lo studio. In tutti i casi, le immagini PET sono state analizzate e per ogni tumore sono stati definiti i principali parametri semi-quantitativi e quantitativi: SUVmax, SUVmean, il volume metabolico del tumore (MTV) e la glicolisi totale delle lesioni (TLG = MTV x SUVmean). I campioni istologici prelevati durante la chirurgia sono stati analizzati e per ogni paziente sono state ottenute due sezioni consecutive da 2 μ m per la marcatura con anticorpi anti HIF-1 α (R&D Systems, Milano, Italia) e CD68 (Dako, Milano, Italia) seguendo un protocollo standardizzato di immunoistochimica (IHC). L'immunoreattività dei campioni è stata valutata semi-quantitativamente e gli score ottenuti sono stati confrontati con l'imaging. Il follow-up mediano della popolazione di studio è stato di 25.8 mesi.

Risultati: L'IHC sui campioni di NSCLC ha dimostrato un'elevata espressione di HIF-1 α in 17 dei 29 (60%) pazienti operati. L'intensità della immunoreattività è stata classificata come segue: debole (score 1) in 8 casi, moderata (score 2) in 5 casi, e alta (score 3) in 4 casi. Rispetto ai dati PET, il SUVmax, SUVmean e la TLG sono risultati significativamente correlati con l'intensità di HIF-1 α ($p < 0.05$). Più specificamente, lo score 2 ha dimostrato i valori più alti rispetto allo score 1 e 3: questo risultato appare più probabilmente legato alla maggiore presenza di necrosi tumorale ed eterogeneità di colorazione immunoistochimica associate ai livelli più elevati di ipossia. I macrofagi CD68+ sono stati identificati ampiamente in tutti i campioni analizzati, confermando il loro ruolo funzionale nel microambiente tumorale. Confrontando l'immunoreattività per i CD68+ con l'espressione di HIF-1 α abbiamo notato una tendenza molto simile a quella riscontrata con

i parametri semi-quantitativi. Infatti, anche in questo caso troviamo uno score 2 associato ai campioni con maggiore infiltrato macrofagico rispetto agli altri score.

Conclusioni: I nostri risultati mostrano un'associazione tra i parametri identificati alla PET/TC e l'espressione tissutale di HIF-1 α . Inoltre, i macrofagi CD68+ risultano essere la popolazione di cellule immunitarie più rappresentativa, essendo presenti ad alta densità in tutti i campioni esaminati e mostrando una correlazione all'espressione di HIF-1 α simile ai parametri PET.

INTRODUZIONE

Il tumore polmonare non a piccole cellule (NSCLC) è il più comune tumore non-cutaneo e la principale causa di morte per neoplasia in tutto il mondo. Il più importante fattore di rischio è rappresentato dal fumo di sigaretta, per il quale esiste un diretto rapporto causa-effetto, in particolare per alcuni istotipi tumorali, come il carcinoma spinocellulare. Nonostante le persistenti campagne antifumo e l'implementazione dello screening radiologico, solo il 20% dei pazienti presenta all'esordio una malattia limitata di stadio I, il 5% ha uno stadio II, mentre la maggior parte si presenta con una malattia localmente avanzata (stadio III) o metastatica (stadio IV). L'approccio terapeutico e la prognosi sono di conseguenza fortemente influenzate oltre che dall'istotipo tumorale anche dall'estensione di malattia, portando da una sopravvivenza a 5 anni del 67% per lo stadio IA a <1% per lo stadio IV [1]

Il trattamento chirurgico risulta la prima scelta nelle forme limitate e rappresenta nelle forme localmente avanzate la migliore possibilità di cura. Tuttavia, il tasso di sopravvivenza globale a 5 anni rimane modesto e l'aggiunta di un trattamento neoadiuvante alla chirurgia è considerata un'opzione valida per migliorare significativamente la prognosi [2].

La diagnosi strumentale all'esordio, così come la rivalutazione della risposta alla terapia mediante le metodiche di imaging, rivestono un ruolo molto importante nella stratificazione prognostica iniziale del NSCLC e nella pianificazione terapeutica successiva. Ad oggi però non ci sono biomarcatori validati per la selezionare "a priori" dei pazienti che possono beneficiare della chirurgia ed è quindi importante sviluppare nuove metodiche di valutazione per ottimizzare tale selezione.

Un ruolo crescente nella comprensione del comportamento delle cellule maligne è attribuito allo studio del microambiente tumorale, che sembra avere un ruolo attivo e spesso promuovente la carcinogenesi [3]. Questo microambiente è composto in quasi il 50% dei casi da cellule non tumorali, come ad esempio quelle componenti il sistema immunitario, compresi i linfociti, i macrofagi associati al tumore, i fibroblasti, i periciti, e così via [4]. In questo contesto, possono essere favorite alcune condizioni, quali l'ipossia, che impattano direttamente e indirettamente il comportamento del tumore e ne promuovono l'aggressività. E' ragionevole pertanto supporre che la valutazione di questo fenomeno attraverso l'imaging possa dare un contributo importante nella comprensione del microambiente tumorale e del suo impatto sulla prognosi dei pazienti.

Se si escludono le indagini convenzionali, la metodica di diagnostica per immagini di maggiore interesse clinico/scientifico in questo contesto è rappresentata dalla PET/TC. In ambito oncologico, il radiofarmaco PET maggiormente utilizzato è indubbiamente il 18F-fluorodeossiglucosio (FDG), un analogo del glucosio che viene intrappolato attivamente nel tessuto neoplastico [5].

Lo scopo del presente studio è quello di indagare il ruolo dei parametri identificati alla FDG-PET nei pazienti con NSCLC trattati chirurgicamente, confrontando i risultati dell'imaging PET con l'espressione tissutale di HIF-1 α e dell'infiltrato tumorale di macrofagi CD68+.

MATERIALI E METODI

Una serie di 29 pazienti affetti da NSCLC (stadio IA-IIIa; M: F = 22:7) e indagati con FDG-PET prima dell'intervento chirurgico, è stata consecutivamente analizzata per lo studio. Il criteri di inclusione comprendevano l'età superiore ai 18 anni, l'esecuzione di una PET/TC entro 45 giorni dall'intervento chirurgico e la disponibilità dei campioni tumorali per l'analisi immunohistochimica. Le principali caratteristiche della popolazione di studio sono elencate nella **tabella 1**.

Il protocollo di imaging PET e la delineazione del tumore

Le indagini FDG-PET sono state acquisite circa 60 minuti dopo la somministrazione del tracciante in pazienti a digiuno, con un'attività compresa tra 250 e 500MBq, a seconda del peso del paziente. Le immagini del corpo intero sono state ottenute dalla base del cranio a metà coscia con un tomografo integrato PET/TC: (a) Siemens Biograph LSO 6 scanner, con un 6-fetta integrato CT; (B) GE Discovery PET/TC 690, con un 64 strati integrato CT. Le immagini ricostruite sono state poi visualizzate in una workstation GE ADW4.6 (GE Healthcare, Waukesha, WI, USA) e interpretate da medici nucleare esperti.

Le masse tumorali sono state identificate come aree di aumentato accumulo di FDG rispetto al normale parenchima polmonare o altre strutture mediastiniche. Il volume del tumore è stato calcolato mediante la definizione dei volumi tridimensionali di interesse (VOIs) ottenuti mediante l'applicazione di una soglia percentuale del 42%. Queste VOI hanno permesso di calcolare il volume metabolico del tumore (MTV), mentre il SUVmax e il SUVmean sono stati ottenuti dal tessuto all'interno del VOI: il SUVmax è stato definito come il valore del pixel massimo e il SUVmean è stato definito come il SUV medio dentro

il volume tumorale. La glicolisi totale delle lesioni (TLG) è stata ottenuta secondo la seguente formula: $MTV \text{ (ml)} \times SUV_{mean} = TLG$.

Tabella 1: Principali caratteristiche cliniche della coorte in esame

CARATTERISTICHE	No. (%)
No. pazienti	29
Età	67.8 years
Range	(49.4–80.6)
Genere	
Maschio	22 (75.8%)
Femmina	7 (24.2%)
Istologia	
Adenocarcinoma	23 (79.3%)
Carcinoma squamocellulare	6 (20.7%)
Stadio	
IA	7 (24.1%)
IB	13 (44.8%)
IIA	5 (17.2%)
IIIA	4 (13.8%)
Trattamento	
Chemioterapia adiuvante	4 (13.8%)
Radioterapia	2 (7.9%)
Prognosi	
Nessuna evidenza di malattia	13 (44.8%)
Recidiva	8 (27.6%)
Morte	1 (3.4%)
Perso nel follow-up	7 (24.1%)

Analisi immunoistochimica

I campioni istologici ottenuti dalla chirurgia sono stati analizzati e per ogni paziente sono state ottenute due sezioni consecutive da 2 μ m per la marcatura con anticorpi anti HIF-1 α (R&D Systems, Milano, Italia) e CD68 (Dako, Milano, Italia) seguendo un protocollo standardizzato di immunoistochimica (IHC). L'immunoreattività dei campioni è stata valutata semi-quantitativamente e gli score ottenuti sono stati calcolati in base all'intensità della immunoreattività, classificata come segue: debole (score 1), moderata (score 2) e alta (score 3). I risultati dell'IHC sono stati poi correlati con i parametri valutati all'imaging PET. La significatività statistica è stata fissata a $p < 0.05$ per ogni analisi.

RISULTATI

La colorazione immunoistochimica sui campioni di NSCLC ha dimostrato la presenza di una significativa espressione di (HIF)-1 α in 17 dei 29 (60%) campioni. L'intensità di immunoreattività è risultata debole (score 1) in 8 casi, moderata (score 2) in 5 casi e alta (score 3) in 4 casi. Rispetto ai dati PET, l'intensità di espressione di HIF-1 α nei campioni analizzati è risultata significativamente correlata ai parametri semi-quantitativi PET: SUVmax ($p=0.006$), SUVmean ($p=0.005$) e TLG ($p=0.003$).

Più specificamente, lo score 2 ha dimostrato valori semi-quantitativi più alti rispetto allo score 1, dato questo coerente con un livello più basso di ipossia per lo score 1; lo score 2 è risultato però significativamente più alto anche rispetto allo score 3: questo risultato appare più probabilmente legato alla maggiore presenza di necrosi tumorale ed eterogeneità di colorazione immunoistochimica associata ai livelli più elevati di ipossia.

Un altro dato molto interessante è emerso anche dalla valutazione dell'infiltrato macrofagico tumorale. In tutti i campioni esaminati, abbiamo riscontrato la presenza di un numero elevato di macrofagi CD68+ associati al tumore (**Fig. 1**). Anche per questo dato abbiamo valutato la correlazione con i parametri semi-quantitativi, senza evidenziare però una significativa correlazione (**Fig. 2**).

Confrontando l'immunoreattività per i CD68+ con l'espressione di HIF-1 α abbiamo notato una tendenza molto simile a quella riscontrata rispetto ai parametri semi-quantitativi (**Fig. 3**). Infatti, anche in questo caso troviamo uno score 2 associato ai campioni con maggiore infiltrato macrofagico rispetto agli altri score.

DISCUSSIONE

Il nostro studio evidenzia un'associazione diretta tra l'ipossia tumorale valutata mediante l'espressione di HIF-1 α nei campioni chirurgici di NSCLC e l'intensità di captazione alla FDG PET/CT. Tale risultato appare in linea con quanto teorizzato in precedenza, confermando inoltre i dati di altri studi simili [6-10]. La spiegazione razionale dello studio è presto detta. Il tracciante impiegato nel nostro caso, nonché quello a più ampia diffusione in ambito oncologico (FDG), rappresenta un analogo del glucosio che viene intrappolato nel tessuto neoplastico in seguito alla glicolisi aerobica, fenomeno questo altrimenti nota come effetto Warburg [5]. Anche in condizioni di ipossia, per livelli ridotti di ossigeno ($pO_2 \downarrow$), l'FDG è attivamente accumulato dalle cellule tumorali che lo usano per la produzione di ATP nel processo metabolico chiamato glicolisi anaerobica, anche noto come effetto Pasteur [11]. In entrambi i casi, la resa di ATP in corso di glicolisi risulta molto scarsa (~ 4 mol ATP/mol di glucosio) se si confronta con quella della fosforilazione ossidativa (~ 36 mol ATP/mol di glucosio) e pertanto si assiste ad un accumulo del tracciante nettamente più marcato nel tessuto tumorale rispetto a quelli normali. Esiste tuttavia una vasta sovrapposizione tra l'accumulo di FDG in condizioni di aerobiosi e quella in condizioni di glicolisi anaerobica [12], non consentendo una chiara distinzione *in vivo* dei due fenomeni. Ciononostante, il fatto che l'ipermetabolismo tumorale possa essere influenzato da HIF-1 α [6,13] offre un valido razionale per l'uso dell'FDG come marker surrogato di ipossia, e, indirettamente, come marker prognostico [14]. L'ipossia infatti svolge un ruolo importante non solo nella captazione dell'FDG, attraverso la sovra-espressione dei trasportatori del glucosio (GLUT) intermediata da HIF-1 α [6], ma anche di altri target genetici coinvolti nella proliferazione cellulare, nella sopravvivenza cellulare, nell'angiogenesi, nell'invasione e metastatizzazione tumorale.

L'accumulo di FDG sotto l'effetto Warburg è stato osservato però non solo nelle cellule tumorali, ma anche in cellule immunitarie durante l'infiammazione tumore – relata oppure nell'infiltrato tumorale, rappresentato in buona parte dai macrofagi [15]. Queste cellule infatti, soprattutto quando attivate, presentano un significativo aumento del metabolismo glucidico [16-18]. Tale aspetto sembra trovare riscontro nel nostro studio, vista l'ampia presenza di infiltrato macrofagico a livello di tutti i campioni tissutali. Quello che appare interessante e nuovo nella nostra analisi è il trend di correlazione dell'immunoreattività di HIF-1 α sia con la captazione di FDG e sia con l'infiltrazione di macrofagi CD68+. In entrambi i casi infatti troviamo uno score 2 per HIF-1 α (intensità di

marcatura moderata) associato ai campioni con maggiore infiltrato macrofagico e con SUVmax maggiore rispetto agli altri score (**Fig. 3**). La spiegazione biologica di tale atteggiamento è facilmente comprensibile in quanto la presenza di ipossia evidenziata da livelli più alti di score richiama un numero maggiore di macrofagi, fintanto che non si raggiungono livelli tali di scarsa ossigenazione da portare a necrosi, da cui anche la minore presenza di infiltrato per gli score 3. Similmente, lo score 2 ha dimostrato valori semi-quantitativi più alti rispetto allo score 1, dato questo coerente con un livello più basso di ipossia, ma anche per lo score 3: questo risultato appare più probabilmente legato alla maggiore presenza di necrosi tumorale ed eterogeneità di colorazione immunoistochimica associata ai livelli più elevati di ipossia.

Quello che manca alla presente analisi è la correlazione dei parametri analizzati con la prognosi dei pazienti, a conferma dell'impatto biologico dell'ipossia e del microambiente tumorale sull'andamento della neoplasia. Nella sessione a seguire, verrà analizzato direttamente l'impatto prognostico dell'ipossia valutata questa volta con un tracciante PET specifico per la sua identificazione *in vivo*.

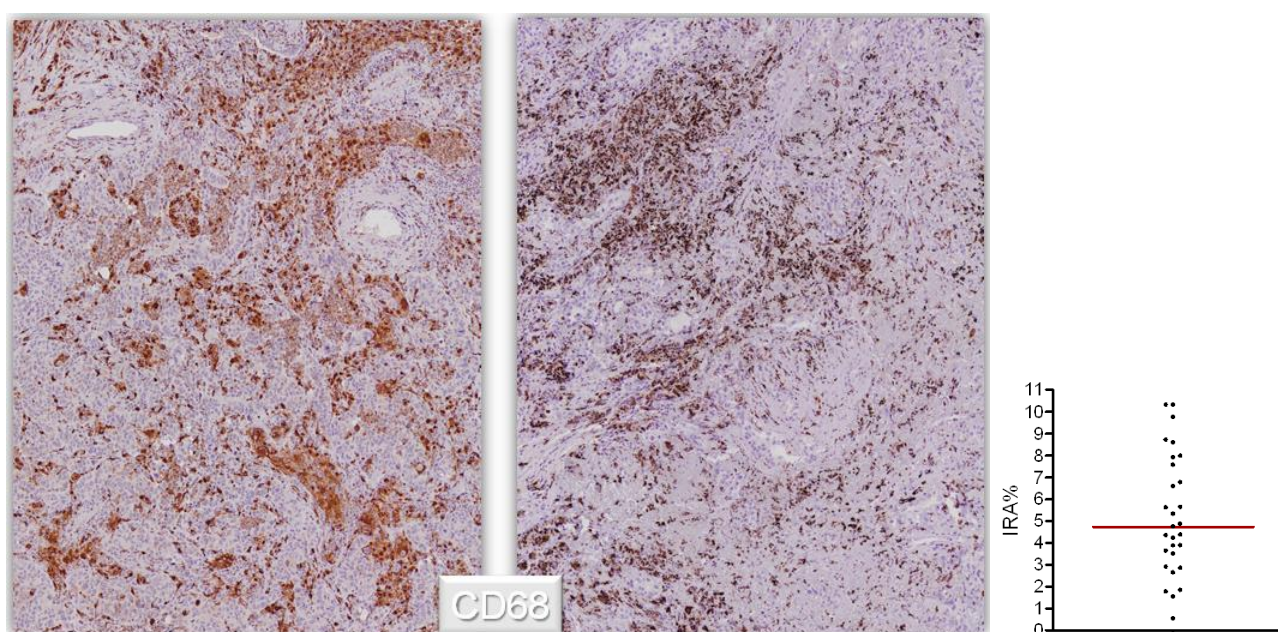


Figura 1: Raffigurazione della colorazione immunoistochimica per la ricerca dei macrofagi CD68+ in due campioni distinti; affianco viene rappresentato il grafico con la distribuzione dell'immunoreattività per i CD68+ sull'intera popolazione.

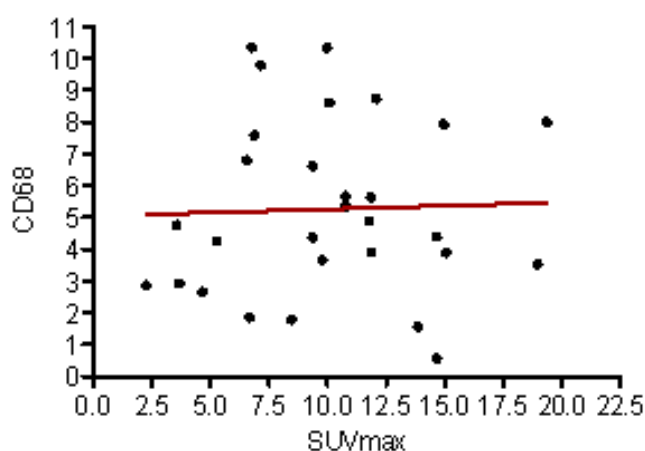
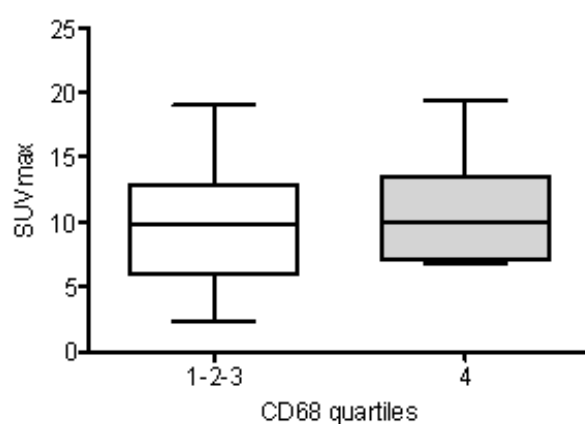
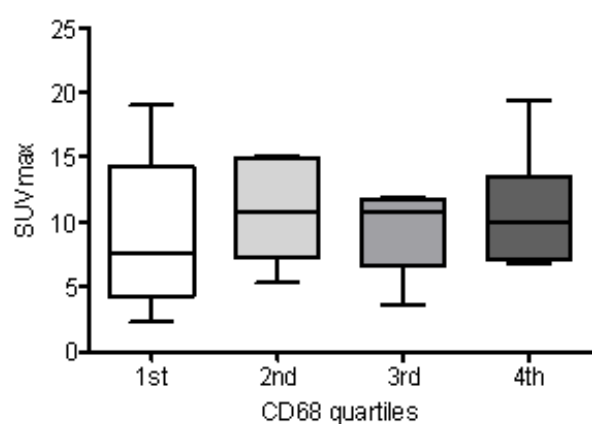


Figura 2: Raffigurazione grafica della correlazione tra il SUVmax delle lesioni e la positività per i macrofagi CD68+ espressa in quartili (immagini in alto); diagramma di distribuzione con analisi di correlazione lineare tra le due variabili (SUVmax e IRA% di CD68+) analizzate in continuo (immagine in basso).

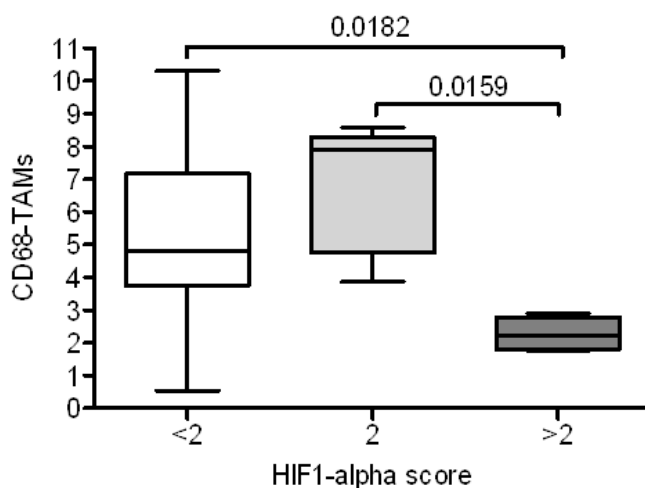
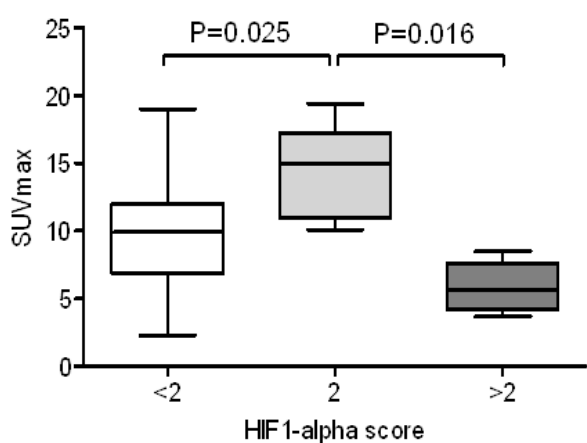


Figura 3: Raffigurazione grafica della correlazione tra il SUVmax e gli score per HIF-1 α (immagine a sinistra) e quella tra in macrofagi associati al tumore (TAMs) CD68+ e gli stessi score di HIF-1 α .

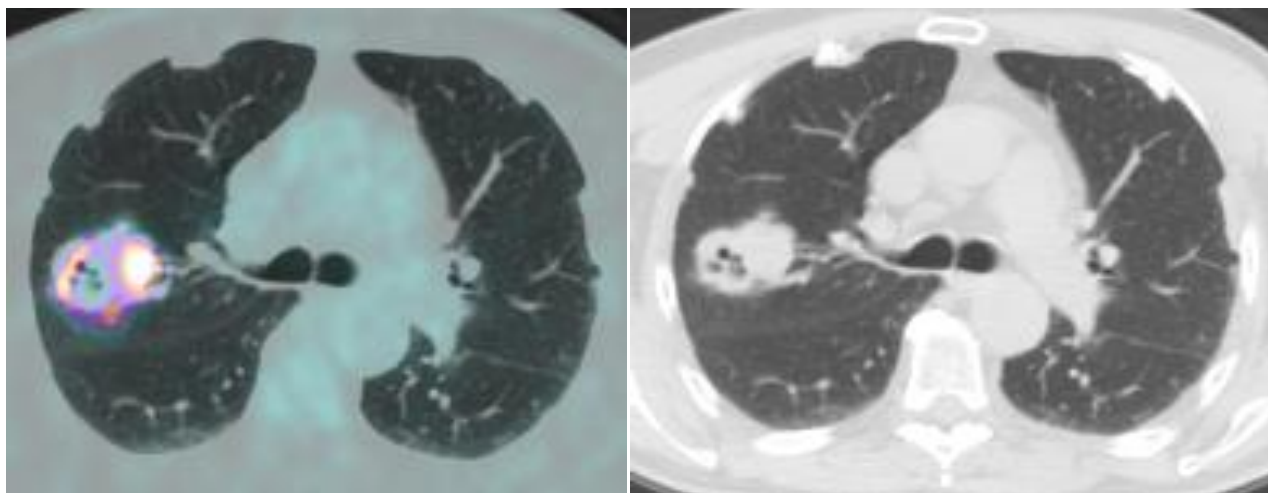


Figura 4: Raffigurazione di una caso esemplificativo di NSCLC visto alle immagini fuse PET/TC (a sinistra) e TC con finestra per il polmone (destra); notate l'eterogenea captazione del tracciante in corrispondenza della lesione, compatibilmente con un atteggiamento metabolico diverso in funzione di una diversa struttura intratumorale.

BIBLIOGRAFIA

- 1- Saintigny P, Burger JA. Recent advances in non-small cell lung cancer biology and clinical management. *Discov Med* 2012;13(71):287-97.
- 2- Burdett S, Rydzewska LH, Tierney JF, et al. NSCLC Meta-analysis Collaborative Group. *Lancet* 2014;383(9928):1561-71.
- 3- Hanahan D, Coussens LM. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell* 2012;21(3):309-22.
- 4- Balkwill FR, Capasso M, Hagemann T. The tumor microenvironment at a glance. *J cell Sci* 2012;125(Pt 23):5591-6.
- 5- Warburg O, Wind F, Negelein E. The metabolism of tumors in the body. *J Gen Physiol* 1927; 8: 519–30.
- 6- van Baardwijk A, Doms C, van Suylen RJ, et al. The maximum uptake of ¹⁸F-deoxyglucose on positron emission tomography scan correlates with survival, hypoxia inducible factor-1a and GLUT-1 in non-small cell lung cancer. *Eur J Cancer* 2007;43:1392-1398
- 7- Burgman P, Odonoghue JA, Humm JL, Ling CC. Hypoxia-induced increase in FDG uptake in MCF7 cells. *J Nucl Med* 2001;42:170–5.
- 8- Thomas GV, Tran C, Mellinghoff IK, et al. Hypoxia-inducible factor determines sensitivity to inhibitors of mTOR in kidney cancer. *Nat Med* 2006;12:122–7.

- 9- Minn H, Clavo AC, Wahl RL. Influence of hypoxia on tracer accumulation in squamous-cell carcinoma: in vitro evaluation for PET imaging. *Nucl Med Biol* 1996;23:941–6.
- 10-Pugachev A, Ruan S, Carlin S, et al. Dependence of FDG uptake on tumor microenvironment. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005;62:545–53.
- 11-Busk M, Horsman MR, Kristjansen PE, et al. Aerobic glycolysis in cancers: implications for the usability of oxygen-responsive genes and fluorodeoxyglucose-PET as markers of tissue hypoxia. *Int J Cancer* 2008;122(12):2726-34.
- 12-Lopci E, Grassi I, Chiti A, et al. PET radiopharmaceuticals for imaging of tumor hypoxia: a review of the evidence. *Am J Nucl Med Mol Imaging* 2014;4(4):365-84.
- 13-Dierckx RA, Van de Wiele C. FDG uptake, a surrogate of tumour hypoxia? *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2008;35(8):1544-9.
- 14-Chang CF, Rashtian A, Gould MK. The use and misuse of positron emission tomography in lung cancer evaluation. *Clin Chest Med* 2011;32(4):749-62.
- 15-Palsson-McDermott EM, O'Neill LAJ. The Warburg effect then and now: from cancer to inflammatory diseases. *BioEssays* 2013; 35:965–73.
- 16-Appelberg R, Moreira D, Barriera-Silva P, et al. The Warburg effect in mycobacterial granulomas is dependent on the recruitment and activation of macrophages by interferon- γ . *Immunology* 2015; 145(4):498-507.
- 17-Newsholme P, Curi R, Gordon S, Newsholme EA. Metabolism of glucose, glutamine, long-chain fatty acids and ketone bodies by murine macrophages. *Biochem J* 1986; 239:121–5.
- 18-McGettrick AF, O'Neill LAJ. How metabolism generates signals during innate immunity and inflammation. *J Biol Chem* 2013; 288:22893–7.

VALORE PROGNOSTICO DEL CU-ATSM NEI TUMORI SOLIDI

NOTE: Ai fini del progetto di ricerca afferente al dottorato in Scienze Mediche Specialistiche del XXVIII ciclo, il contenuto della presente sessione è stato presentato come comunicazione orale (**OP310: Lopci et al. *⁶⁴Cu-ATSM PET/CT in solid tumours: a prognostic evaluation for disease outcome***) all'ultimo congresso annuale EANM svoltosi a Amburgo nell'Ottobre 2015. L'abstract è stato prescelto come uno dei migliori lavori sulla *Clinical Oncology* dello stesso congresso ed è stato selezionato tra i candidati per il premio EANM Eckert & Ziegler Abstract Award 2015. L'articolo in esteso è stato pubblicato ai fini del dottorato di ricerca: **Lopci et al. *Clin Nucl Med.* 2016 Feb;**41(2):e87-92****. Il testo è riprodotto in Italiano previa autorizzazione dell'editore Dr. Domenico Rubello.

ABSTRACT: Ruolo della PET/TC con il tracciante ^{64}Cu -ATSM per l'ipossia nella valutazione prognostica dei tumori solidi

Scopo dello studio: Il ^{64}Cu -ATSM è un radiofarmaco PET molto promettente per l'imaging tumorale dell'ipossia, in quanto offre un segnale tumore-fondo migliore rispetto agli altri traccianti di questo tipo. Lo scopo del presente studio è quello di identificare i parametri semi-quantitativi e quantitativi ottimali alla ^{64}Cu -ATSM PET in una coorte di pazienti oncologici, con particolare attenzione al loro valore prognostico rispetto all'esito della malattia.

Materiali e Metodi: Ai fini dello studio sono stati arruolati 18 pazienti consecutivi (M: F = 13: 5; età media 60.7 anni) affetti da NSCLC localmente avanzato o seguiti per neoplasia del testa-collo (HNC), esaminati prima dell'inizio della terapia con una ^{64}Cu -ATSM PET. Ogni partecipante ha ricevuto 105-500MBq di tracciante in base al peso ed è stato sottoposto a scansione in 3D-mode su un tomografo PET/TC circa 60 minuti dopo l'iniezione del tracciante. Le immagini PET sono state ricostruite e visualizzate su una workstation GE ADW4.6 per la definizione dei parametri quantitativi e semi-quantitativi: SUVmax, SUVmean, SUVratio-sul-muscolo, volume ipossico (HTV) e carico ipossico totale (HB = HTV x SUVmean). Questi dati sono stati successivamente correlati all'esito della malattia, espresso in termini di sopravvivenza libera da progressione (PFS) calcolata su un periodo di follow-up mediano di 14,6 mesi.

Risultati: In tutti i pazienti analizzati, le lesioni tumorali sono state identificate alla PET/TC mostrando un assorbimento medio/alto di ^{64}Cu -ATSM: valore medio di SUVmax 5.2 (range: 1.9-8.3) e di SUVratio 4.4 (range: 1.6-6.8). Le lesioni hanno mostrato un ampio range di HTV e HB, con valori medi di 99.3cm³ (range: 2.5-453.7) e 301 (range: 4.2-1134), rispettivamente. L'analisi ROC (Receiver Operating Characteristic) ha identificato come cut-off di riferimento rispetto al decorso della malattia i seguenti valori: SUVmax>2.5 (AUC 0.57; sens. 88.9%; spec. 50%), SUVratio≤4.4 (AUC 0.60; sens. 50; spec. 83.3 %), HTV> 160.7cm³ (AUC 0.61; sens. 55.6%; spec 75%), e HB> 160.7 (AUC 0.67; sens. 58.3%; spec. 83.3%). Nella nostra coorte, il parametro HB ha mostrato una differenza statisticamente significativa in termini di valori medi al test ANOVA rispetto alla progressione di malattia (p=0.04). All'analisi univariata, la regressione di Cox ha confermato questi risultati e ha mostrato una correlazione significativa col PFS sia per HB (p=0.05) che per HTV (p=0.02).

Conclusioni: La definizione dei parametri semi-quantitativi e quantitativi ottimali alla ^{64}Cu -ATSM PET/TC appare fattibile e in linea con i dati precedentemente pubblicati. Se si considera il ruolo prognostico rispetto all'esito della malattia, i parametri più robusti sono rappresentati dal volume ipossico tumorale (HTV) e dal carico ipossico totale (HB).

INTRODUZIONE

L'efficacia dei trattamenti attualmente disponibili per la cura dei tumori maligni si basa su molte caratteristiche della neoplasia, tra le quali viene compresa anche l'ossigenazione e la vascolarizzazione tumorale. Queste caratteristiche indirizzano direttamente all'ipossia e ai suoi meccanismi intracellulari d'azione. In condizioni di ipossia, il comportamento biologico dei tumori maligni subisce delle modifiche e tende ad essere associato ad una maggiore aggressività, un maggiore rischio di metastasi a distanza, così come una maggiore probabilità di recidiva e resistenza ai comuni regimi terapeutici locali o sistemici [1]. Per le ragioni sopra esposte, la necessità di determinare l'espressione di ipossia prima della chemio e radioterapia, insieme all'ottimizzazione delle dosi terapeutiche in base alla sua presenza, rappresenta uno degli obiettivi più importanti per la diagnostica tumorale in generale e per l'imaging molecolare in particolare.

Tra le modalità di imaging per la valutazione dell'ipossia, la PET rappresenta quella con la più ampia evidenza scientifica e con la più ampia gamma di radiofarmaci a disposizione [2]. Tra questi, il Cu-ATSM o diacetile-bisN4-methylthiosemicarbazone (Cu-ATSM) è uno dei composti PET più promettenti [1]. Molti studi *in vivo* e *in vitro* hanno evidenziato il suo accumulo attivo in diversi tipi di tumore in funzione del livello di ossigenazione dei tessuti, con in aggiunta alcuni importanti vantaggi rispetto ad altri traccianti per l'ipossia, come ad esempio: a) una rapida concentrazione nei tessuti bersaglio; b) un assorbimento significativamente più alto nelle lesioni ipossiche rispetto alle zone ben ossigenate [1, 3, 4]. Come conseguenza, il segnale tumore-fondo risulta migliorato, garantendo una delineazione del tumore più facilitata e di qualità migliore, soprattutto nell'ottica di definire ottimamente i bersagli tumorali nei pazienti candidati a radioterapia esclusiva e/o a chemio-radioterapia [5]. Queste stesse caratteristiche fanno sì che il Cu-ATSM possa dare informazioni predittive della risposta alla terapia, definendo in un certo senso la prognosi dei pazienti [1, 6-9].

Tra i radionuclidi utilizzati per la marcatura dell'ATSM, il rame-64 (^{64}Cu) rappresenta il migliore in termini di compromesso per tempo di decadimento ($T_{1/2} = 12.7$ ore), risoluzione spaziale e qualità dell'immagine [8]. Ad oggi però esiste un'evidenza scientifica limitata sul ruolo di questo specifico radiofarmaco (^{64}Cu -ATSM) nella valutazione dell'ipossia nei tumori solidi prima della terapia [10], e, a differenza di altri nuclidi del rame, cioè ^{60}Cu e ^{62}Cu , i parametri semi-quantitativi e quantitativi di captazione non sono stati ancora determinati, in particolare se messi in correlazione alla

prognosi dei pazienti. L'attuale studio si prefigge lo scopo di analizzare i parametri semi-quantitativi e quantitativi ottimali per la ^{64}Cu -ATSM PET nella stessa coorte di pazienti oncologici, con particolare attenzione alla loro correlazione con l'esito della malattia.

MATERIALI E METODI

Popolazione in studio

Ai fini dello studio sono stati arruolati 18 pazienti consecutivi (M:F=13:5; età media 60.7 anni) con NSCLC localmente avanzato ($n = 7$) o neoplasia del testa-collo (HNC) esaminati con ^{64}Cu -ATSM PET/TC prima di iniziare il trattamento chemio/radioterapico. La coorte è stata arruolata da due studi prospettici distinti approvati dal comitato etico locale e eseguiti in conformità con i principi di buona pratica clinica. I criteri di inclusione comprendevano i pazienti ≥ 18 anni di età con una diagnosi istologica di NSCLC o HNC in fase avanzata, non operabile, e candidati alla radioterapia e/o chemioterapia. Nella **tabella 1** sono riassunte le principali caratteristiche della coorte di studio.

Tabella 1: Riassunto delle caratteristiche cliniche principali della coorte di studio

PAZIENTI	SESSO	ETA' (anni)	PRIMITIVO	ISTOLOGIA	STADIO	TRATTAMENTO	ESITO
1	M	82	HNC	SCC	IVB	Radioterapia	DOD
2	M	54	HNC	SCC	IVA	Radioterapia	NED
3	F	64	HNC	SCC	II	Chemio neoadiuvant + Radioterapia	NED
4	M	57	HNC	SCC	IVB	Chemio neoadiuvant + Radioterapia	NED
5	F	45	HNC	SCC	IVA	Radioterapia + Chemio adiuvante	DOD
6	M	50	HNC	SCC	IVA	Radioterapia	DOD
7	M	55	HNC	SCC	III	Radioterapia + Chemio adiuvante	NED
8	M	56	HNC	SCC	III	Chemio neoadiuvant + Radioterapia	NED
9	M	55	HNC	SCC	II	Radioterapia	AWD
10	M	59	HNC	Simil-linfoepitelioma	IVA	Chemio neoadiuvant + Radioterapia	AWD
11	M	45	HNC	SCC	IVA	Chemio neoadiuvant + Radioterapia	DOD
12	M	81	NSCLC	ADK	IV	Terapia di supporto *	DOD

13	M	77	NSCLC	SCC	IIIB	Chemioinduzione + Radioterapia	NED
14	F	66	NSCLC	ADC	IV	Chemioinduzione + Radioterapia	DOD
15	F	65	NSCLC	ADC	IV	Chemioinduzione	DOD
16	M	68	NSCLC	SCC	IIIA	Radioterapia	AWD
17	M	64	NSCLC	ADC	IIIA	Chemioinduzione + Radioterapia	AWD
18	F	50	NSCLC	ADC	IV	Radioterapia	AWD

Abbreviazioni: M = Maschio; F = Femmina; HNC = Tumore testa-collo; NSCLC = non-small cell lung cancer; SCC = carcinoma squamocellulare; ADC = adenocarcinoma; DOD = died of disease; NED = no evidence of disease; AWD = alive with disease; * il paziente è morto precocemente dopo la diagnosi ricevendo solo cure palliative.

Produzione ^{64}Cu -ATSM e protocollo PET/TC

Il radiofarmaco è stato prodotto in loco, come descritto in precedenza [10], dalla radiofarmacia PET del Policlinico Universitario S. Orsola-Malpighi. Il nuclide ^{64}Cu è stata ottenuto con l'irradiazione protonica di un bersaglio solido di ^{64}Ni arricchito, che dà origine ad un composto ad attività variabile con la gamma da 350 a 500mCi secondo la quantità di ^{64}Ni elettrolitico (160-200 mg) e una purezza del 99,98% [11]. Ogni partecipante ha ricevuto 105-500MBq di ^{64}Cu -ATSM in base alle dimensioni del corpo. I pazienti sono stati sottoposti a scansione in modalità 3-dimensionale (Discovery GE, Milwaukee, WI) 60 minuti dopo l'iniezione. Il campo visivo ha incluso solo la regione di interesse che comprendeva il torace per i pazienti con NSCLC e il distretto testa-collo per i pazienti con HNC. L'acquisizione PET è stato fissata a 7 min/ posizione letto, e le immagini sono state ricostruite con una TC a basse dosi per la correzione dell'attenuazione.

Analisi delle immagini e del tumore delineazione

La immagini PET sono state visualizzate su una workstation GE Adw4.6 per la definizione dei volumi di interesse e dei parametri semi-quantitativi che includevano il SUVmax, il SUVratio-sul-muscolo (rapporto tra SUVmax del tumore e SUV del muscolo fissato al livello del trapezio), il SUVmean, il volume tumorale ipossico (HTV) e il carico ipossico totale ($\text{HB} = \text{HTV} \times \text{SUVmean}$). L'identificazione delle lesioni patologiche è stata eseguita visivamente basandosi sulle lesioni precedentemente identificate alle metodiche standard, che comprendevano la TC con mezzo di contrasto e la ^{18}F -FDG PET/TC (**Fig.**

1). Nessuna soglia fissa è stata applicata per la definizione delle lesioni sulla 64Cu-ATSM PET/TC, sebbene l'assorbimento del muscolo utilizzato come tessuto di riferimento è stato utilizzato come valore indicativo per delineare delle lesioni patologiche.

Analisi statistiche

I parametri semi-quantitativi e quantitativi PET sono stati correlati all'esito della malattia, espressa in termini di sopravvivenza libera da progressione (PFS) calcolato su un periodo di follow-up mediano di 14.6 mesi. La PFS è stata definita come il tempo tra la diagnosi fino alla progressione/recidiva, morte per qualsiasi causa, o l'ultima visita in cui il paziente era in vita senza progressione. Gli hazard ratio (HR) con intervalli di confidenza al 95% (IC) sono stati calcolati con il modello di regressione di Cox mediante analisi uni- e multivariata. Per le variabili continue, una ROC analisi (Receiver Operating Characteristic) è stata effettuata al fine di trovare i valori ottimali di cut-off in grado di discriminare i pazienti in differenti gruppi prognostici. Per i dati continui, le differenze tra i gruppi sono state confrontate al T-test o Wilcoxon test, se indicato. La significatività statistica è stata fissata a $p \leq 0.05$ per ogni valutazione. Le analisi dello studio sono state eseguite su un software statistico MedCalc (MedCalc Software BVBA © 1993-2014, <http://medcalc.org/>).

RISULTATI

Tutte le lesioni tumorali nella coorte di studio sono state identificate e caratterizzate da un assorbimento da moderatamente a fortemente aumentato di 64Cu-ATSM: SUVmax range 1.9-8.3, con un valore medio di 5.2; SUVratio range 1.6-6.8, con un valore medio di 4.4; SUVmean range da 1.0-6.8, con un valore medio di 2.8. Un'ampia gamma di valori per HTV e HB è stata definita: valori medi di 99.3cm³ (range 2.5-453.7) e 301 (4.2-1134), rispettivamente. Nella **Fig. 2** sono rappresentate la media e la mediana dei parametri analizzati alla 64Cu-ATSM PET con le rispettive deviazioni standard (SD).

Un'analisi separata per i due tipi di tumore, cioè NSCLC e HNC, è stata effettuata in relazione ai dati semi-quantitativi e quantitativi summenzionati. Nessuna differenza statisticamente significativa in termini di valori medi e mediani è stata osservata per SUVmax, SUVratio e HB tra NSCLC e le lesioni HNC (**tabella 2**). Al contrario, i parametri delle localizzazioni da NSCLC sono risultate significativamente maggiori al T-test e al test di Wilcoxon rispettivamente per i valori medi e mediani ($p=0.02$).

La captazione del tumore è stata successivamente analizzata rispetto ad esito della malattia, classificando la coorte in due categorie: remissione vs progressione/recidiva. Sulla base di questa dicotomizzazione, l'analisi ROC ha identificato come cut-off di riferimento rispetto al decorso della malattia i seguenti valori: SUVmax > 2.5 (AUC 0.57; sensibilità 88.9%; specificità 50%), SUVratio ≤ 4.4 (AUC 0.60; sensibilità 50; specificità 83.3%), HTV > 160.7cm³ (AUC 0.61; sensibilità 55.6%; la specificità 75%), e HB > 160.7 (AUC 0.67; sensibilità 58.3%; specificità del 83.3%). Quando considerati separatamente al test ANOVA, tra i suddetti parametri solo HB ha dimostrato una differenza statisticamente significativa in termini di valori medi rispetto al decorso della malattia (p=0.04). Nella **Fig. 3** è mostrato il diagramma di distribuzione dei valori corrispondenti al HB classificati come remissione o progressione/recidiva di malattia (**Fig. 4**).

Le analisi univariate eseguite con il modello di regressione di Cox hanno confermato l'associazione statisticamente significativa di HB con la prognosi del paziente, questa volta definita dalla PFS (p=0.05). Inoltre, un'associazione statisticamente significativa è stata trovata anche per HTV e PFS (p=0.02). Nella **tabella 3** sono rappresentati i risultati delle analisi univariate per tutti i parametri PET.

Tabella 2: Distribuzione dei parametri PET analizzati della coorte di studio e classificati in base alla localizzazione del tumore.

Parametro	HNC			NSCLC			p value
	Media	Mediana	SD	Media	Mediana	SD	
SUVmax	4.9	4.9	3.1	5.4	5.4	0.6	*0.18 ^0.25
SUVratio	4.2	4.9	1.6	4.7	4.6	1.2	*0.92 ^0.95
HTV	30.1	7.4	36.4	185.9	172.3	136.7	*0.02 ^0.02
HB	107.6	34.3	156.7	468.1	551.6	363.4	*0.11 ^0.13

Note: * = confronto con T-test; ^ = confronto con il test di Wilcoxon.

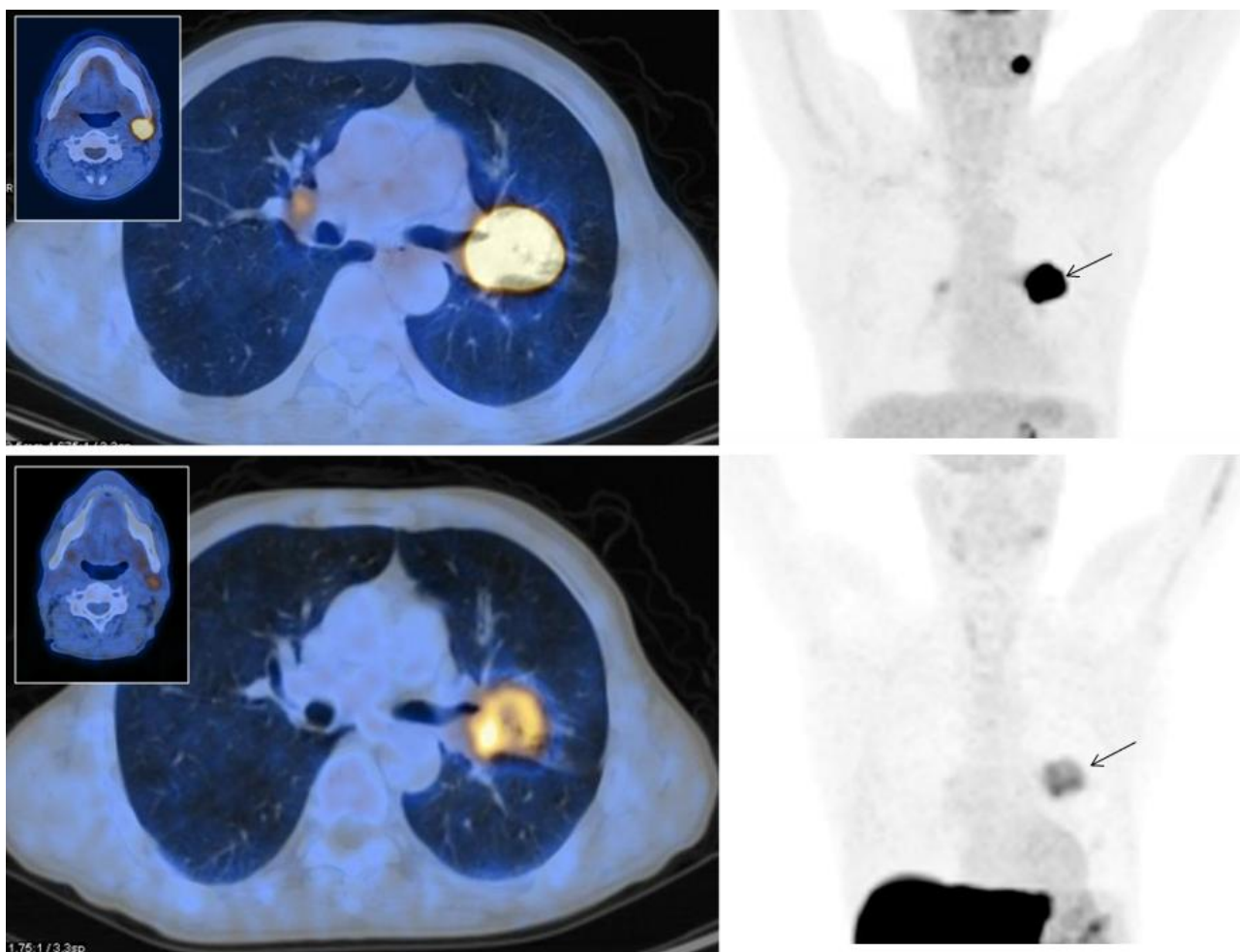


Figura 1: Immagini di un paziente affetto da NSCLC dell'ilo polmonare sinistro allo stadio IIIA studiato con la ^{18}F -FDG PET/CT (immagini in alto) e con la ^{64}Cu -ATSM PET/CT (immagini in basso); in entrambe le indagini la lesione tumorale ha mostrato un'elevata captazione del tracciante (freccette). L'accumulo del radiofarmaco in sede laterocervicale sinistra risulta ascrivibile a tumore di Warthin, caratterizzato da un'elevata captazione di FDG ma con una bassa espressione di ipossia, come visibile alla ^{64}Cu -ATSM PET/CT.

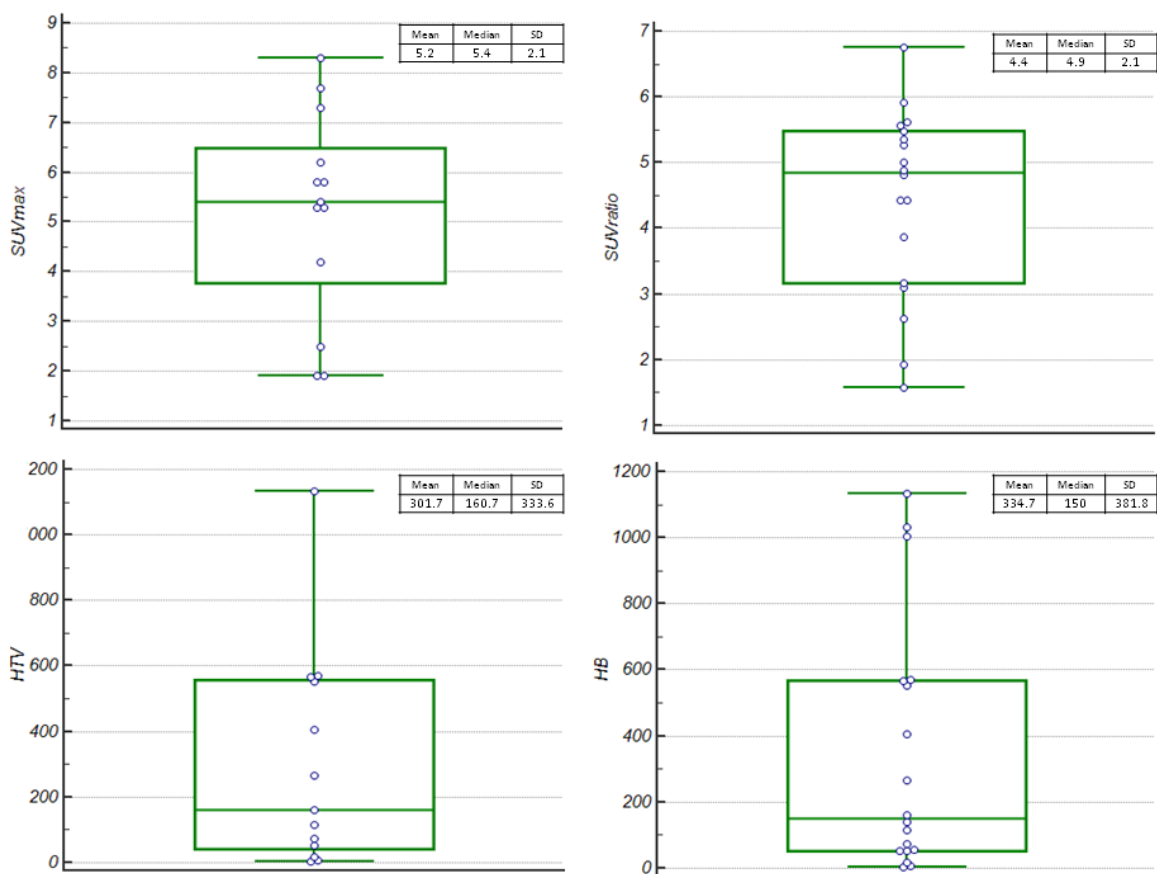


Figura 2: Diagrammi di distribuzione dei valori identificati per il SUVmax, SUVratio-su-muscolo, HTV and HB alla 64Cu-ATSM PET/TC e corrispettivi valori medi, mediane e deviazioni standard (SD).

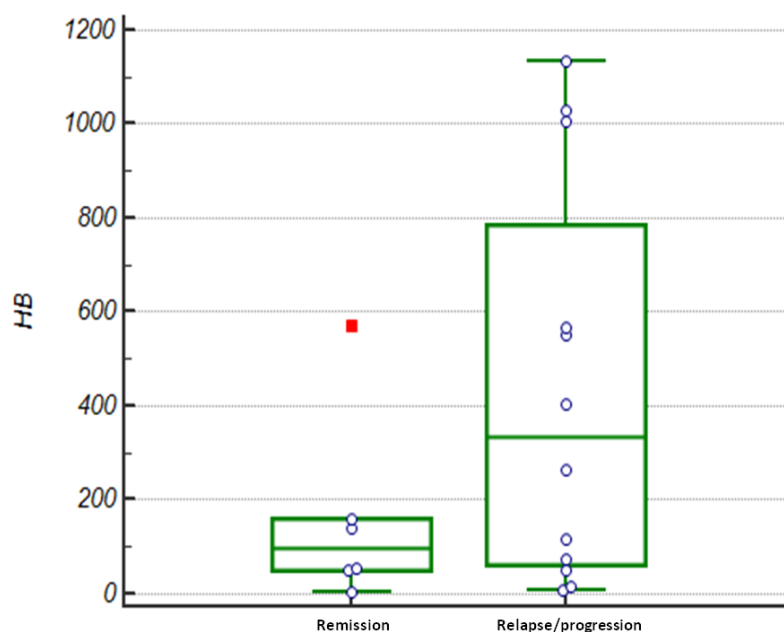


Figura 3: Diagramma di distribuzione dei valori di HB nell'intera coorte, classificati in termini di remissione o progressione/recidiva di malattia ($p=0.04$).

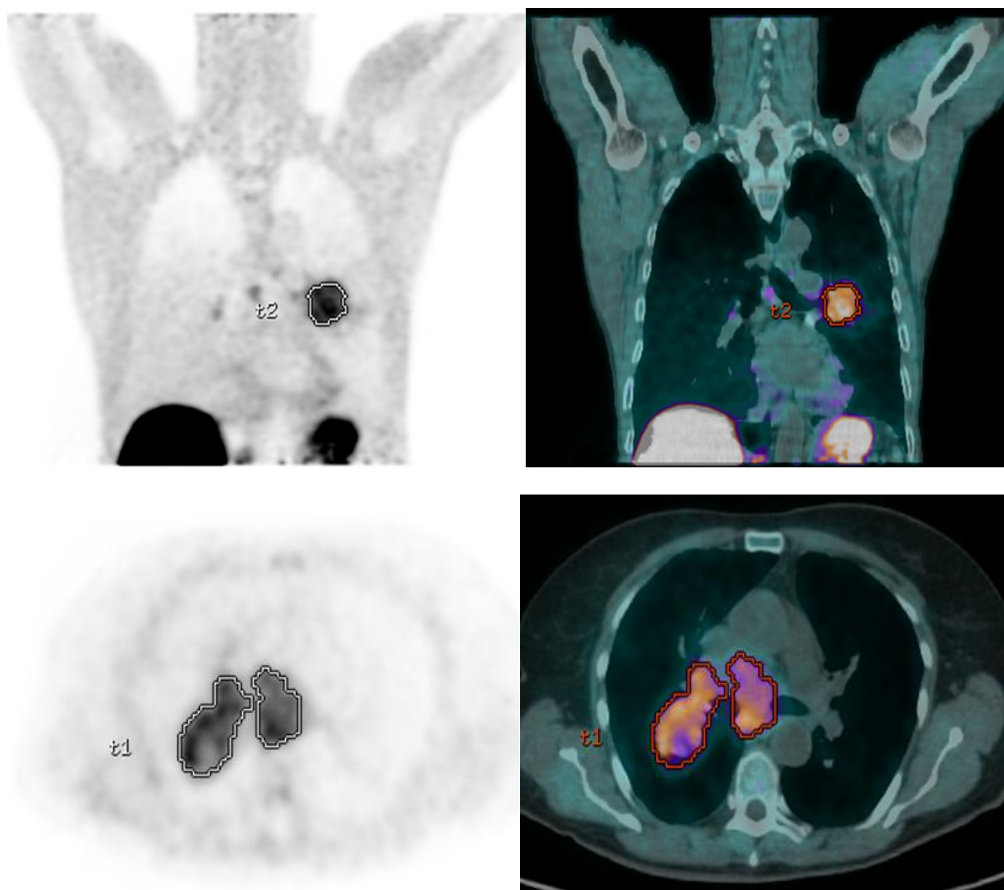


Figura 4: Immagini di confronto tra due pazienti con NSCLC esaminati alla ^{64}Cu -ATSM PET/TC che hanno evidenziato una netta differenza in termini prognostici; il paziente nelle immagini sopra ha poi ottenuto una risposta completa (PFS 13.1 mesi), mentre il paziente sotto è andato in progressione precoce ed è morto dopo pochi mesi (PFS 3.1 mesi).

Tabella 3: Valore prognostico dei differenti parametri PET rispetto alla PFS.

Parametri	ANALISI UNIVARIATA PER PFS	
	p value	HR (95% IC)
SUVmax	0.31	1.17 (0.86; 1.59)
SUVratio	0.50	1.14 (0.78;1.66)
HTV	0.02	1.00 (1.00; 1.01)
HB	0.05	1.00 (1.00; 1.00)

DISCUSSIONE

Il trattamento di scelta in molti pazienti oncologici clinicamente non operabili oppure con tumori inoperabili perché localmente avanzati è rappresentato dalla radioterapia esclusiva o dalla combinazione di chemio-radioterapia. Tra questi troviamo il tumore polmonare non a piccole cellule (NSCLC) e il carcinoma del testa-collo (HNC) [12]. Al momento sappiamo che oltre il 50%-60% di queste neoplasie localmente avanzate è caratterizzato da aree di ipossia, fenomeno questo considerato tra quelli fondamentali nel influenzare il comportamento del tumore e la sua risposta alla chemio e radioterapia [13, 14]. A partire dagli anni '60, Tomlinson e Gray hanno dimostrato la presenza di regioni di scarsa ossigenazione nel cancro del polmone, e hanno osservato che questa caratteristica del microambiente tumorale è associata ad una maggiore resistenza alla radioterapia [14-16]. In condizioni di ossigenazione normale l'effetto delle radiazioni sulla morte cellulare è proporzionale alla quota di radicali liberi di O₂, mentre in presenza di ipossia l'impatto sul DNA è ridotto e per raggiungere la stessa attività terapeutica la quantità di radiazioni deve essere nettamente aumentata [17, 18]. Le cellule tumorali ipossiche manifestano inoltre una diminuita apoptosi, una vascolarizzazione alterata e una maggiore indipendenza dal controllo locale della crescita, determinando in tal modo una maggiore resistenza a molti agenti chemioterapici [10, 19].

Il Cu-ATSM è un radiofarmaco molto promettente per l'imaging dell'ipossia [2, 10]. Il suo meccanismo di assorbimento, come descritto per la prima volta da Fujibayashi et al. [20], si basa su processi di bioriduzione citosolico/microsomiali all'interno della cellula vivente, che portano al progressivo intrappolamento in condizioni di ipossia del rame radiomarcato nel comparto intracellulare [21, 22]. Questo accumulo ipossia-dipendente è stata descritto in vari modelli animali e studi clinici comprendenti i tumori cerebrali, il HNC, il NSCLC, il cancro cervicale e quello rettale [1, 6-9, 23]. Inoltre, in analisi dedicate su pazienti con glioma, l'assorbimento di Cu-ATSM è risultato predittivo non solo dell'espressione di HIF-1 α , ma anche del grado tumorale e della presenza di componenti necrotiche e regioni contrastate alla RMN [24].

Il primo studio ad essere stato condotto nell'uomo riguarda una coorte di pazienti con tumore polmonare confrontato in termini di captazione (al ⁶²Cu-ATSM) con soggetti normali [25]. Successivamente, Dehdashti et al. [1] hanno analizzato più in dettaglio il ruolo di questo tracciante per l'imaging dell'ipossia in 19 pazienti con NSCLC, definendo inoltre un valore di T/M di 3.0 in grado di discriminare la prognosi dei pazienti. Gli autori

riportano in 14 dei questi 19 pazienti con NSCLC una differenza statisticamente significativa in termini di T/M nei *responders* rispetto ai *non responders* (**tabella 4**). Lo stesso gruppo ha indagato altri tumori solidi con ^{62}Cu -ATSM, iniziando con il cancro cervicale [6, 7, 23]. La captazione di tracciante in questo caso è stata inversamente correlata alla sopravvivenza libera da progressione, alla sopravvivenza globale e alla sopravvivenza tumore-specifica [6, 7]. Il cut-off ottimale per il valore T/M è stato identificato come 3.5. In un'altra coorte selezionata di 15 pazienti con carcinoma della cervice, la captazione di ^{62}Cu -ATSM è stata associata ad una espressione aumentata di VEGF, EGFR, COX-2, CA-9, ad un aumento dell'apoptosi, oltre ad una prognosi più scarsa [23].

Il risultato è stato invece leggermente diverso per il cancro del retto [8], per il quale il valore di T/M mediano è risultato predittivo della prognosi. In questo studio, i tumori con $\text{T/M} > 2.6$ hanno avuto una sopravvivenza libera da progressione e una sopravvivenza globale peggiore rispetto a quelli con captazione inferiore alla mediana (**tabella 4**).

Tabella 4: Ruolo prognostico del Cu-ATSM nei tumori solidi come riportato in letteratura

AUTORI	PAZIENTI	TUMORE	NUCLIDE	PARAMETRI	CUT-OFF	SIGNIFICATO
Dehdashti et al. 2003 [1]	19	NSCLC	^{60}Cu	T/M	3.0	Risposta valutato in 14/19 pazienti: T/M significativamente più basso nei <i>responders</i> (1,5 \pm 0,4) rispetto ai <i>non responders</i> (3.4 \pm 0.8) (p=0.002)
Dehdashti et al. 2003-2 [6]	14	Cancro alla cervice	^{60}Cu	T/M [^] (%/min)	3.5 [^]	La captazione tumorale era inversamente correlata alla sopravvivenza libera da progressione e alla sopravvivenza globale (log-rank p=0.0005 e p=0.015, rispettivamente)
Dehdashti et al. 2008 [7]	38	Cancro alla cervice	^{60}Cu	T/M	3.5	La captazione tumorale era inversamente correlata alla sopravvivenza libera da progressione e a quella tumore-specifica (p=0.006 e p=0.04, rispettivamente)
Grigsby et al. 2007 [23]	15	Cancro alla cervice	^{60}Cu	T/M	3.5	L'ipossia con Cu-ATSM è stata correlata con un'iperespressione di VEGF, EGFR, COX-2, CA-9, un aumento dell'apoptosi, e una prognosi peggiore.

Dietz et al. 2008 [8]	17	Cancro del retto	60Cu	T/M*	2.6*	La sopravvivenza globale e quella libera da progressione erano peggio nei tumori ipossici (T/M > 2.6)
Minagawa et al. 2011 [9]	17	HNC	62Cu	SUVmax	5.0	SUVmax differiva in modo significativo tra i pazienti con o senza tumore residuo/ recidivante (p < 0.05)
Grassi et al. 2014 [10]	11	HNC	64Cu	SUVmax BTV	-	La sensibilità e la specificità di 64Cu-ATSM nel predire la risposta erano del 100% e 50% per il SUVmax e 100% e 33% per il volume.

Abbreviazioni: T/M = Ratio Tumore-muscolo; BTV = Biological target volume; VEGF = vascular endothelial growth factor; EGFR = epidermal growth factor receptor; COX-2 = cyclo-oxygenase-2; CA-9 = carbonic anhydrase IX; ^ = si riferisce a T/M; * = valori medi

Il gruppo dall'Università di Yokohama ha valutato condizioni simili in 17 pazienti con HNC localmente avanzato studiati con 62Cu-ATSM prima della chemio o radioterapia [9]. Loro hanno osservato un SUVmax significativamente differente nei pazienti con tumore residuo/recidivante (p<0.05) rispetto ai pazienti senza malattia a 2 anni di follow-up post-irradiazione. Più in particolare, tutti i pazienti curati avevano un SUVmax <5.0, valore questo proposto in questa coorte come cut-off ottimale. Anche nella nostra esperienza precedente con 64Cu-ATSM nei pazienti con HNC [10] abbiamo correlato il SUVmax e il volume del target biologico (BTV) nelle lesioni ipossiche con la risposta alla chemio e/o radioterapia. Nel nostro studio, abbiamo osservato un'elevata sensibilità in entrambi i casi (100%), ma una specificità relativamente bassa, 50% e 33% rispettivamente. Nessun valore di cut-off è stato applicato per il SUVmax o il T/M in questa coorte, mentre è stato fatto un confronto side-by-side con la 18F-FDG PET nella definizione dei volumi per la pianificazione della radioterapia. Nel presente studio abbiamo incluso nella stessa analisi i pazienti con HNC e NSCLC localmente avanzato. La popolazione è stata selezionata al fine di definire i parametri ottimali per SUVmax, SUVratio, e per i volumi ipossici espressi come HTV e HB. Se si esclude il valore di cut-off per SUVmax con una sensibilità elevata, ma una bassa specificità, gli altri parametri individuati hanno mostrato una maggiore specificità nella definizione prognostica. Queste analisi hanno confermato che i parametri semi-quantitativi e quantitativi ottimali su 64Cu-ATSM PET sono fattibili e in linea con i dati precedentemente pubblicati [1, 6-9]. Quello che c'è di nuovo nel nostro approccio è l'identificazione dei parametri volumetrici, che sono risultati i predittori più robusti per l'esito

della malattia. Infatti, abbiamo notato che i tumori con HTV e HB maggiore tendevano ad avere una prognosi peggiore. Per quanto a nostra conoscenza, questo è il primo report che descrive la correlazione di questi due parametri all'ipossia e alla sopravvivenza libera da progressione nei tumori solidi.

BIBLIOGRAFIA

1. Dehdashti F, Mintun MA, Lewis JS, et al. In vivo assessment of tumor hypoxia in lung cancer with 60Cu-ATSM. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2003; 30:844-50.
2. Lopci E, Grassi I, Chiti A, et al. PET radiopharmaceuticals for imaging of tumor hypoxia: a review of the evidence. *Am J Nucl Med Mol Imaging* 2014;4:365-84.
3. Lewis JS, McCarthy DW, McCarthy TJ, et al. The evaluation of 64Cu-diacetyl-bis(N4-methylthiosemicarbazone)(64Cu-ATSM) in vitro and in vivo in a hypoxic tumor model. *J Nucl Med* 1999; 40:177–183.
4. Lewis JS, Sharp TL, Laforest R, et al. Tumor uptake of copper-diacetyl-bis(N4-methylthiosemicarbazone): effect of changes in tissue oxygenation. *J Nucl Med* 2001; 42:655–661.
5. Nyflot MJ, Harari PM, Yip S, et al. Correlation of PET images of metabolism, proliferation and hypoxia to characterize tumor phenotype in patients with cancer of the oropharynx. *Radiother Oncol* 2012;105:36-40.
6. Dehdashti F, Grigsby PW, Mintun MA, et al. Assessing tumor hypoxia in cervical cancer by positron emission tomography with 60Cu-ATSM: relationship to therapeutic response – a preliminary report. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* 2003; 55:1233-38.
7. Dehdashti F, Grigsby PW, Lewis JS, Laforest R, Siegel BA, Welch MJ. Assessing tumor hypoxia in cervical cancer by PET with 60Cu-labeled diacetyl-bis(N4-methylthiosemicarbazone). *J Nucl Med* 2008; 49(2):201-5.
8. Dietz DW, Dehdashti F, Grigsby PW, et al. Tumor hypoxia detected by positron emission tomography with 60Cu-ATSM as a predictor of response and survival in patients undergoing Neoadjuvant chemoradiotherapy for rectal carcinoma: a pilot study. *Dis Colon Rectum* 2008; 51:1641-8.
9. Minagawa Y, Shizukuishi K, Koike I, et al. Assessment of tumor hypoxia by 62Cu-ATSM PET/CT as a predictor of response in head and neck cancer: a pilot study. *Ann Nucl Med* 2011; 25:339-345.

10. Grassi I, Nanni C, Cicoria G, et al. Usefulness of ^{64}Cu -ATSM in Head and Neck Cancer: A preliminary Prospective Study. *Clin Nucl Med* 2014;39:e59-e63.
11. Obata A, Kasamatsu S, McCarthy DW, et al. Production of therapeutic quantities of ^{64}Cu using a 12 MeV cyclotron. *Nucl Med Biol*. 2003;30:535-539.
12. Geets X, Gregoire V, Lee JA. Implementation of hypoxia PET imaging in radiation therapy planning. *Q J Nucl Med Mol Imaging* 2013;57:271-82.
13. Mees G, Dierckx R, Vangestel C, Van de Wiele C. Molecular imaging of hypoxia with radiolabelled agents. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2009; 36:1674–1686.
14. Apte S, Chin FT, Graves EE. Molecular imaging of hypoxia: strategies for probe design and application. *Curr Org Synth* 2011;8:593-603.
15. Thomlinson RH, Gray LH. The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy. *Br J Cancer* 1955; 9:539–549.
16. Gray LH, Conger AD, Ebert M, Hornsey S, Scott OCA. The concentration of oxygen dissolved in tissues at the time of irradiation as a factor in radiotherapy. *Br J Radiol* 1953; 26:638–648.
17. Carlson DJ, Keall PJ, Loo BW Jr, et al. Hypofractionation results in reduced tumor cell kill compared to conventional fractionation for tumors with regions of hypoxia. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2011; 79 1188.
18. Horsman MR, Mortensen LS, Petersen JB, et al. Imaging hypoxia to improve radiotherapy outcome. *Nature Reviews Clinical Oncology* 2012; 9:674-687
19. Semenza GL. Evaluation of HIF-1 inhibitors as anticancer agents. *Drug Discovery Today*; 2007;12:853-9.
20. Fujibayashi Y, Taniuchi H, Yonekura Y, et al. Copper-62-ATSM: A new hypoxia imaging agent with high membrane permeability and low redox potential. *J Nucl Med*;1997 38:1155–60.
21. Hustinx R, Eck SL, Alavi A. Potential Applications of PET Imaging in Developing Novel Cancer Therapies. *J Nucl Med* 1999; 40:995-1002.
22. Chen K, Che X. Positron Emission Tomography Imaging of Cancer Biology: Current Status and Future Prospects. *Semin Oncol* 2011; 38(1): 70-86.
23. Grigsby PW, Malyapa RS, Higashikubo R, et al. Comparison of molecular markers of hypoxia and imaging with ^{60}Cu -ATSM in cancer of the uterine cervix. *Mol Imaging Biol* 2007;9:278-283.
24. Tateichi K, Tateishi U, Sato M, et al. Application of ^{62}Cu -diacetyl-bis (N4-methylthiosemicarbazone) PET imaging to predict highly malignant tumor grades and

hypoxia-inducible factor-1a expression in patients with glioma. *AJNR Am J Neuroradiol* 2013; 34(1):92-9.

25. Takahashi N, Fujibayashi Y, Yonekura Y, et al. Evaluation of ⁶²Cu labeled diacetyl-bis(N4-methylthiosemicarbazone) as a hypoxic tissue tracer in patients with lung cancer. *Ann Nucl Med* Oct;2000;14:323–8.

CONFRONTO TRA LE IMMAGINI PRECOCI E TARDIVE ALLA PET CON CU-ATSM

NOTE: Ai fini del progetto di ricerca afferente al dottorato in Scienze Mediche Specialistiche del XXVIII ciclo, il contenuto della presente sessione è stato presentato come comunicazione orale (**OP532:** Lopci et al. ***Early and late evaluation of solid tumours with ^{64}Cu -ATSM PET/CT: a computer-aided fractal analysis***) all'ultimo congresso annuale EANM svoltosi a Amburgo nell'Ottobre 2015. L'abstract è stato selezionato come candidato per il prestigioso premio EANM Marie Curie Award 2015, oltre ad essere tra gli abstract candidati per il premio Eckert & Ziegler Abstract Award 2015. Ai fini del dottorato di ricerca il lavoro in esteso è stato preparato e inoltrato per pubblicazione.

ABSTRACT: Analisi frattale di confronto tra le immagini ^{64}Cu -ATSM PET/CT precoci e tardive ottenute nella valutazione dell'ipossia nei tumori solidi

Scopo dello studio: Il ^{64}Cu -ATSM è un radiofarmaco impiegato nell'imaging PET per l'ipossia tumorale. A causa della lunga emivita del radionuclide, il tracciante permette l'acquisizione di immagini sia precoci, cioè a circa un'ora dalla somministrazione, che tardive. Tuttavia, non esiste ad ora un confronto puntuale delle due acquisizioni per verificare la coerenza delle immagini. L'attuale studio si propone pertanto di analizzare le acquisizioni precoci e tardive alla ^{64}Cu -ATSM PET/TC nella stessa coorte di pazienti, confrontando le informazioni ottenute dai parametri quantitativi e semi-quantitativi e mediante l'analisi geometrica frattale delle immagini DICOM.

Materiali e Metodi: Per il presente studio abbiamo analizzato le immagini di cinque pazienti oncologici affetti da neoplasia localmente avanzata del polmone (NSCLC) oppure del testa-collo (HNC). Ogni partecipante è stato studiato con una ^{64}Cu -ATSM PET/TC prima dell'inizio della terapia, eseguita come segue: dopo somministrazione di 105-500MBq di tracciante in base al peso corporeo, ogni paziente è stato sottoposto a scansione in 3D-mode su un tomografo PET/TC a 60 minuti (immagini precoci) e 16 ore (immagini tardive) dall'iniezione. Le immagini PET sono state ricostruite e visualizzate su una workstation GEAdw4.6 per la definizione dei parametri semi-quantitativi e quantitativi: SUVmax, SUVratio-sul-muscolo, SUVmean, volume ipossico (HV) e carico ipossico ($\text{HB} = \text{HV} \times \text{SUVmean}$). I dati DICOM recuperati da entrambe le scansioni sono stati successivamente analizzati utilizzando un software progettato *ad hoc* per determinare il valore di intensità medio (MIV), la deviazione standard (SD), la dispersione relativa (RD); l'istogramma 3D della dimensione frattale (3D HIST FR DIM) e la dimensione frattale in 3D (3D FD). Le differenze tra i parametri sono state statisticamente confrontate con il test di Student, considerando come significativi i valori di $p < 0.05$.

Risultati: Tutti i pazienti analizzati hanno mostrato un aumentato assorbimento di ^{64}Cu -ATSM nelle lesioni tumorali, con mediana all'imaging precoce di SUVratio-sul-muscolo di 4.42, di SUVmax di 5.3, di SUVmean di 2.8. I valori di HTV e HB all'imaging precoce sono risultati rispettivamente di 41.6cm³ e 161.5cm³. Tutti questi dati semi-quantitativi e quantitativi ottenuti dopo 1 ora sono risultati in linea con gli stessi dati ottenuti all'imaging tardivo ($p > 0.05$). Tuttavia, una differenza statisticamente significativa è stata trovata confrontando il SUVmax del muscolo ($p = 0.045$). L'analisi frattale ha evidenziato che tutti i parametri considerati all'acquisizione precoce e tardiva non mostravano

differenze statisticamente significative ($p > 0.05$). Un valore limite è stato ottenuto per MIV ($p=0.075$).

Conclusioni: I nostri risultati supportano l'uso affidabile di entrambe le acquisizioni ^{64}Cu -ATSM PET/TC per la valutazione dell'ipossia tumorale. Un po' di attenzione va prestata all'utilizzo della captazione muscolare come riferimento per il contornamento prima della radioterapia, in quanto tale parametro varia asseconda che si usino le immagini precoci o tardive.

INTRODUZIONE

Nonostante i nostri progressi nella conoscenza molecolare e cellulare del cancro nell'uomo, tale patologia resta uno dei principali problemi di salute pubblica in tutto il mondo [1]. Tra le principali caratteristiche che rendono le cellule tumorali difficili da curare troviamo la vasta eterogeneità genetica e non genetica che caratterizza le neoplasie. Tale eterogeneità intratumorale può essere valutata mediante tecniche istologiche, così come mediante le metodiche di imaging, tra cui l'imaging molecolare PET. Fino a poco tempo fa, la valutazione dell'eterogeneità all'imaging era limitata a analisi qualitative piuttosto che a valutazioni quantitative. Esiste però la possibilità di combinare algoritmi matematici a tali valutazioni portando ad una quantificazione anche dei fenomeni biologici più complessi, che sono soliti cambiare comportamento nel tempo e nello spazio. Se a ciò aggiungiamo la possibilità di identificare i diversi aspetti dell'ambiente tumorale con l'uso di radiofarmaci specifici, si può arrivare a comprendere meglio tali fenomeni biologici e a dare loro un adeguato significato prognostico.

Indubbiamente l'ipossia è una delle caratteristiche più rilevanti dei tumori solidi. In questo contesto, noi sappiamo che il diacetile-bisN4-methylthiosemicarbazone, o Cu-ATSM, è un radiofarmaco PET usato proprio per l'imaging dell'ipossia tumorale [2-6]. Tra i radionuclidi più promettenti usati nella marcatura dell'ATSM troviamo il rame-64 (^{64}Cu) [7]. A causa della lunga emivita del radionuclide ($T_{1/2}=12.7\text{ore}$), è possibile ottenere immagini precoci e tardive alla PET/TC. Tuttavia, non esiste ad ora un confronto puntuale delle due acquisizioni per verificare la coerenza delle immagini in termini di distribuzione intralesionale del tracciante e di eterogeneità tumorale. Tra le metodiche di analisi delle immagini, uno degli approcci più interessanti per quantificare l'eterogeneità spaziale è la cosiddetta geometria frattale [8]. Diversamente dalla più antica geometria euclidea, che può essere applicata solo per oggetti levigati e di forma regolare, la geometria frattale risulta uno strumento valido per lo studio dei sistemi biologici complessi.

L'attuale studio si propone pertanto di analizzare le acquisizioni precoci e tardive alla ^{64}Cu -ATSM PET/TC nella stessa coorte di pazienti, confrontando le informazioni ottenute dai parametri quantitativi e semi-quantitativi e mediante l'analisi geometrica frattale delle immagini DICOM.

MATERIALI E METODI

Popolazione di pazienti

Per il presente studio abbiamo reclutato 5 pazienti consecutivi (M: F = 2: 3; età media: 60.7 anni) con NSLCL localmente avanzato (n=2) o neoplasia del testa-collo (HNC) afferenti a due protocolli distinti approvati del comitato etico locale. La coorte ha ottemperato i seguenti criteri di inclusione: a) acquisizione duale ^{64}Cu -ATSM PET/TC in fase precoce e tardiva; b) pazienti ≥ 18 anni di età; c) diagnosi istologica di NSCLC o HNC in fase avanzata; d) pazienti non eleggibili per chirurgia upfront e candidati a radioterapia e/o chemioterapia. La **tabella 1** riassume le caratteristiche basali dei pazienti inclusi nella coorte di studio.

Table 1: Principali informazioni cliniche della coorte di studio.

PATIENTI	SESSO	ETA'	PRIMITIVO	ISTOLOGIA	STADIO	TRATTAMENTO	ESITO
1	F	64	HNC	SCC	II	Chemio neoadjuvante + Radioterapia	NED
2	M	57	HNC	SCC	IVB	Chemio neoadjuvante + Radioterapia	NED
3	M	68	NSCLC	SCC	IIIA	Radioterapia	AWD
4	F	66	NSCLC	ADC	IV	Induzione + Radioterapia	DOD
5	F	65	NSCLC	ADC	IV	Induzione	DOD

Notes: M = Maschio; F = Femmina; HNC = Head and neck carcinoma; NSCLC = non-small cell lung cancer; SCC = squamous cell carcinoma; ADC = adenocarcinoma; DOD = died of disease; NED = no evidence of disease; AWD = alive with disease.

Acquisizione di immagini e delineazione del tumore

Ogni partecipante ha ricevuto 105-500MBq di ^{64}Cu -ATSM in base al peso corporeo ed è stato scansionato in modalità tridimensionale (3D) su un tomografo PET/TC a circa 60 minuti (fase precoce) e 16 ore (fase tardiva) dopo l'iniezione. Il radiofarmaco è stato prodotto in loco, come descritto in precedenza [9], presso la radiofarmacia PET dell'Ospedale S. Orsola-Malpighi. Il campo visivo includeva solo la regione di interesse (ROI), che comprendeva il torace per i pazienti con NSCLC e il distretto testa e collo per i pazienti HNC. L'acquisizione PET è stata fissata a 7 min/letto per posizione e le immagini sono state ricostruite con TC a basse dosi per la correzione dell'attenuazione. Le immagini

sono state poi visualizzate su una workstation GE Adw4.6 per la definizione dei parametri semi-quantitativi e quantitativi: SUVmax, SUVratio-sul-muscolo, SUVmean, volume ipossico (HTV) e carico ipossico ($HB = HV \times SUVmean$). Nessuna soglia fissa è stata applicata per la modellazione delle lesioni sulla ^{64}Cu -ATSM PET/TC, sebbene la captazione a livello del muscolo trapezio sia stata utilizzata come riferimento per delineare le lesioni patologiche.

Analisi frattale computerizzata ad hoc

I dati DICOM recuperati da entrambe le scansioni sono stati analizzati utilizzando un sistema di analisi di immagini realizzato *ad hoc* [SWI Analyzer, Rozzano, Milano, Italia, (Figura 1)], che valuta automaticamente i seguenti parametri: a) valore medio di intensità (MIV), che definisce il valore medio di grigio all'interno della ROI. Questa è la somma dei valori di grigio di tutti i pixel della selezione, diviso per il numero di pixel (**Fig. 1A**). b) Deviazione standard (SD), come misura della quantità di variazione o dispersione dell'insieme dei valori di grigio all'interno della ROI. c) Dispersione relativa (RD), ottenuta dal rapporto tra la deviazione standard e il MIV dei valori di grigio all'interno della ROI. d) Istogramma 3D della dimensione frattale (3D HIST FR DIM), come stima della dimensione frattale dell'istogramma che definisce la distribuzione dei livelli di grigio all'interno della ROI. La serie viene quindi esaminata come una linea monodimensionale (**Fig. 1B**). La dimensione frattale è stata utilizzata per stimare il grado di irregolarità intratumorale. e) Dimensione frattale 3D (3D FD): definisce la dimensione frattale della superficie tridimensionale ROI (**Fig. 1C**).

I dati bidimensionali (2D) e le dimensioni frattali 3D sono state stimate automaticamente mediante il metodo del box-counting. I grafici log-log sono stati tracciati e i segmenti lineari sono stati individuati mediante la regressione al minimo quadrato; i loro gradienti sono stati calcolati con metodo integrale resistente iterativo [10]. Per i dati continui, le differenze tra i gruppi sono stati confrontati con il test di Student. La significatività statistica è stata fissata a $p < 0.05$ per ogni valutazione.

RISULTATI

Tutti i pazienti valutati hanno mostrato un'aumentata captazione di ^{64}Cu -ATSM nelle lesioni tumorali, con mediana all'imaging precoce di SUVratio-sul-muscolo di 4.42 (range: 1.58-5.62), di SUVmax di 5.3 (range: 1.9-7.3), di SUVmean di 2.8 (range: 1.5-3.9).

I valori di HTV e HB all'imaging precoce sono risultati rispettivamente di 41.6cm³ (range: 2.8-453.7 cm³) e 161.5cm³ (range: 4.4-1.112.5), rispettivamente (**tabella 2**).

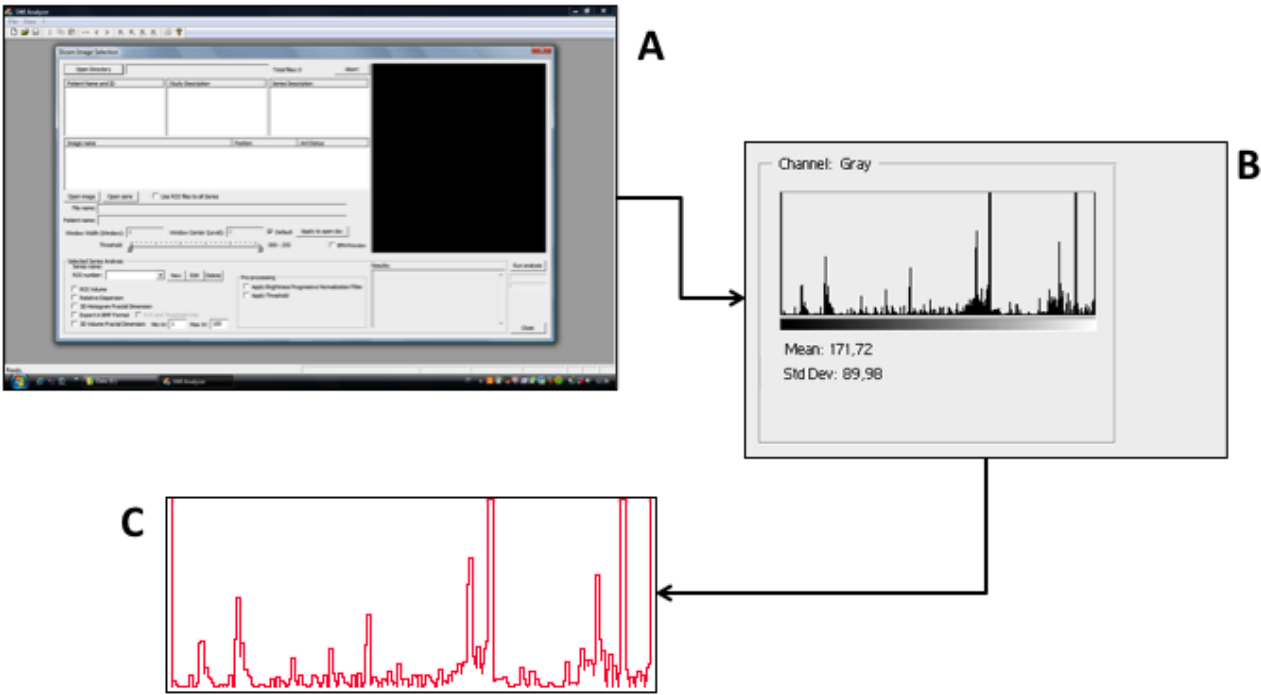


Figura 1: Sistema *ad hoc* computerizzato per l'analisi frattale delle immagine [SWI Analyzer, Rozzano, Milano, Italia]; (A) determina automaticamente l'istogramma dalla somma dei valori di grigio di tutti i pixel nella ROI; (B) quindi genera il contorno irregolare come linea mono-dimensionale; (C) Istogramma 3D della dimensione frattale (3D HIST FR DIM) poi stimato.

Tabella 2: Distribuzione dei parametri PET nella coorte di studio analizzata in base all'acquisizione 64Cu-ATSM PET.

PARAMETRI	PRECOCE		TARDIVA		p value
	Mean	Median	Mean	Median	
SUVmax	5.12	5.3	3.68	4.1	ns
SUVmuscolo	1.26	1.2	0.8	0.8	0.045*
SUVratio	4.06	4.42	5.0	4.77	ns
HV	143.14	41.6	101.36	34.1	ns
HB	382.48	161.5	213.06	89.6	ns

Note: ns = non significativo; * confronto delle medie al T-test.

Tutti questi dati semi-quantitativi e quantitativi ottenuti dopo 1 ora sono risultati in linea con gli stessi dati ottenuti all'imaging tardivo ($p>0.05$). Tuttavia, una differenza statisticamente significativa è stata trovata confrontando il SUVmax del muscolo ($p=0.045$).

L'analisi frattale ha evidenziato che tutti i parametri considerati all'acquisizione precoce e tardiva non mostravano differenze statisticamente significative ($p>0.05$). Un valore limite è stato ottenuto per MIV ($p=0.075$) (**tabella 3**). Questi ultimi dati sono attribuibili principalmente al numero limitato di pazienti analizzati e alla differenza di SUVmax del muscolo, che nella nostra serie è servita come riferimento per la contornazione del tessuto tumorale (**Fig. 2 e 3**).

Tabella 3: Distribuzione dei principali parametri alla geometria frattale e la loro variazione all'imaging precoce e tardivo

Pazienti	VALUTAZIONE PRECOCE						VALUTAZIONE TARDIVA					
	MIV*	SD	RD	3D HIST FR DIM	3D FD	Volume	MIV*	SD	RD	3D HIST FR DIM	3D FD	Volume
1	36,321	7,187	0,197	0,203	1,675	3,63	42,617	8,325	0,195	0,16	1,619	2,719
2	72,392	28,835	0,398	0,275	2,035	37,871	99,011	39,011	0,392	0,42	2,031	32,829
3	21,111	6,916	0,327	0,211	2,112	36,502	78,422	19,327	0,246	0,211	2,05	30,615
4	52,88	16,864	0,318	0,236	2,213	166,81	73,013	32,839	0,449	0,745	1,981	69,068
5	48,475	16,584	0,342	0,326	2,334	412,144	65,795	20,962	0,318	0,412	2,294	330,224

Note: MIV = Mean Intensity Value; SD = Standard Deviation; RD = Relative Dispersion; 3D = Histogram Fractal Dimension; 3D FD = Three-dimensional Fractal Dimension. * solo questo parametro ha mostrato un valore di p borderline in termini di differenza statistica al t-test tra la valutazione precoce e tardiva ($p=0.075$)

DISCUSSIONE

Nonostante le strutture anatomiche siano caratterizzate da forme complesse, quali volumi, superfici e contorni irregolari, alcuni sistemi analitici sofisticati basati sulla geometria euclidea permettono di valutarne in maniera computerizzata le peculiarità e le raffigurazioni strumentali. Per fare ciò è necessario comprendere alcuni dei principi fondamentali della geometria. Tra questi principi troviamo uno dei concetti base per la valutazione degli oggetti geometrici, e cioè il concetto di "dimensione", che è un valore caratteristico di ogni sistema in analisi [10]. Ad ora sono state proposte due definizioni principali di "dimensione". La prima, chiamata "dimensione topologica", è stata introdotta

dal matematico Karl Menger. La dimensione topologica assegna un numero intero per ogni punto dello spazio euclideo, indicato con il simbolo $E3$, e attribuisce una dimensione di valore **0** al "punto", una dimensione di valore **1** alla "linea retta," una dimensione di valore **2** alla "superficie piana," e un valore **3** alle figure "tridimensionali" (o volumi) (**Fig. 4A**). La seconda definizione di dimensione è arrivata da Felix Hausdorff e Abram Samoilovich Besicovitch [10]. Essi attribuiscono un numero reale ad ogni oggetto naturale in $E3$, che si trova tra la dimensione topologica e 3. Benoit Mandelbrot indica la dimensione di Menger con il simbolo D_y e quella di Hausdorff e Besicovitch con il simbolo D . Per tutte le figure euclidee, D_y e D sono coincidenti ($D_y = D$) [10]. Questa uguaglianza non è valida per gli oggetti naturali, compreso quelli biologici, perché per essi si verifica una disuguaglianza (cioè, $D > D_y$). Pertanto, la geometria euclidea non sarebbe quella più adatta per valutare le strutture anatomiche, cosa che invece risulta essere la nuova geometria frattale. Questa geometria appare un mezzo più potente per analizzare la complessità spaziale dei sistemi reali e consente in più la quantificazione della eterogeneità spaziale, caratteristica fondamentale di tutti i tumori umani [10].

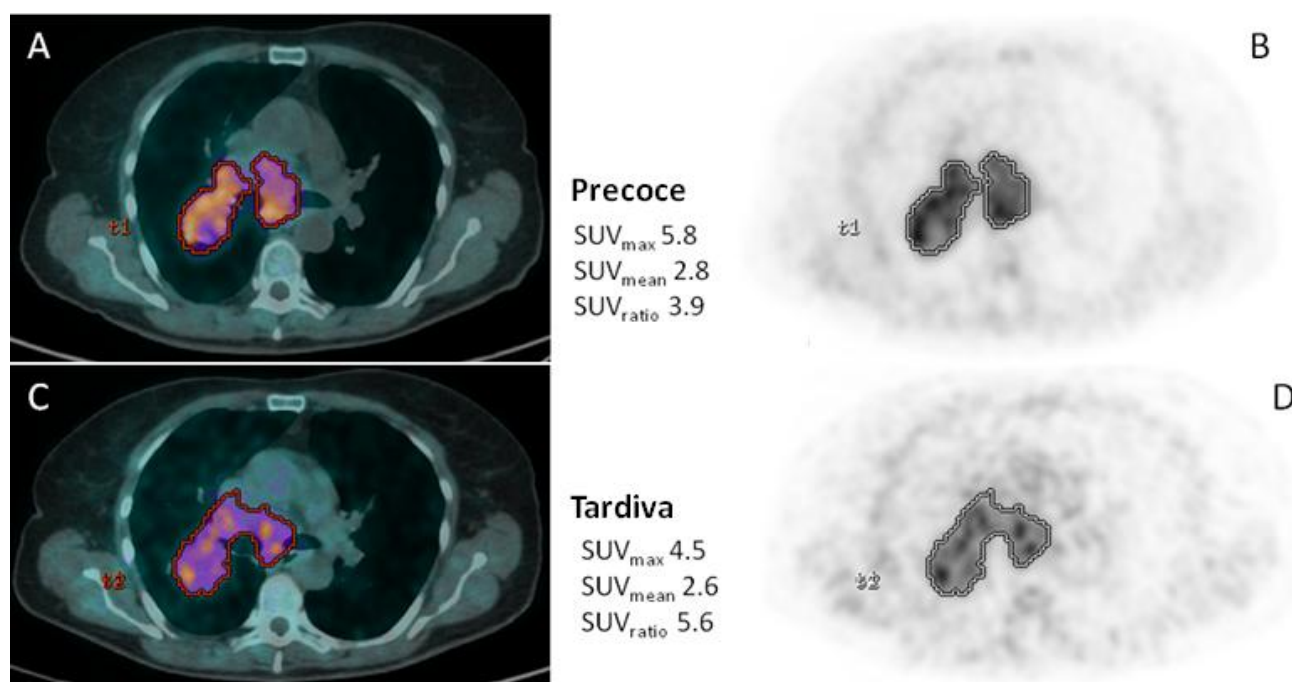


Figura 2: Immagini di riferimento del paziente nr.4 visto nell'acquisizione precoce (immagini sopra) e tardiva (immagini sotto).

Per comprendere la geometria frattale bisogna capire innanzitutto cosa sono gli oggetti frattali e quali sono le loro caratteristiche. Un frattale è un oggetto geometrico dotato di *omotetia* interna, cioè della capacità di ripetere la sua forma su scale diverse, risultando dunque sempre simile all'originale, indipendentemente dall'ingrandimento a cui l'oggetto viene sottoposto [11]. Il termine frattale venne coniato nel 1975 da Benoit Mandelbrot e deriva dal termine latino *fractus*, che significa rotto, spezzato [12]. In termini generali, gli oggetti frattali sono caratterizzati principalmente da quattro proprietà: a) l'irregolarità della loro forma; b) l'auto-similarità della loro struttura; c) la loro dimensione frattale; e d) la scala, il che significa che le proprietà misurate dipendono dalla scala in cui vengono misurate. La dimensione frattale (o *dimensione di Hausdorff*) è un parametro molto importante che determina il "grado di irregolarità" dell'oggetto frattale preso in esame. Tra le proprietà più evidenti di qualsiasi struttura anatomica troviamo l'irregolarità delle forme o dei modelli di distribuzione di un insieme di forme, e la loro diversità dalle figure euclidee. Per tale motivo l'analisi della dimensione frattale appare molto più adatta per la valutazione delle forme anatomiche e della loro raffigurazione strumentale diagnostica.

Anche l'auto-similarità può essere definita "geometricamente" o "statisticamente". Un oggetto è auto-simile geometricamente quando ogni piccolo pezzo di quel oggetto è un esatto, o quasi esatto, duplicato dell'intero oggetto. Tra gli esempi classici di figure auto-simili geometricamente troviamo il "fiocco di neve" e la "curva", descritti da Niels Fabian Helge von Koch, un matematico svedese che ha descritto queste particolari forme geometriche per la prima volta nel 1904 [10], oppure il "triangolo di Sierpinski", descritto dal matematico Waslaw Sierpinski (**Fig. 5**)[13]. Statisticamente l'auto-similarità, indicata anche con il termine di "auto-affinità," riguarda oggetti biologici, comprese tutte le forme anatomiche. I metodi di misurazione dell'auto-similarità sono un potente strumento per lo studio dei sistemi biologici, che sembrano troppo complessi per essere quantificati dalla "semplice" geometria euclidea. Per tale motivo abbiamo deciso di sviluppare una metodologia computerizzata per l'analisi quantitativa delle immagini ⁶⁴Cu-ATSM PET/TC ottenute nella stessa coorte di pazienti mediante analisi parametrica semi-quantitativa e mediante l'applicazione dell'analisi sulla geometria frattale delle immagini DICOM.

I risultati della nostra indagine, che appaiono in esclusiva per questo tracciante, documentano una consistenza statisticamente significativa tra le analisi parametriche e quelle basate sulla geometria frattale nell'acquisizioni precoci e tardive. Nel presente studio abbiamo potuto notare una differenza borderline per MIV e una differenza

statisticamente significativa per il SUVmax del muscolo nei due tempi diversi di acquisizione (**tabella 2 e 3**). Questi risultati ci hanno fatto supporre che dovrebbe essere prestata maggiore attenzione quando si utilizzano i dati ^{64}Cu -ATSM PET per la pianificazione della radioterapia, perché l'accumulo tissutale del muscolo preso come riferimento per la contornazione dei volumi da radiotrattare può mostrare alcune differenze rilevanti tra le due scansioni.

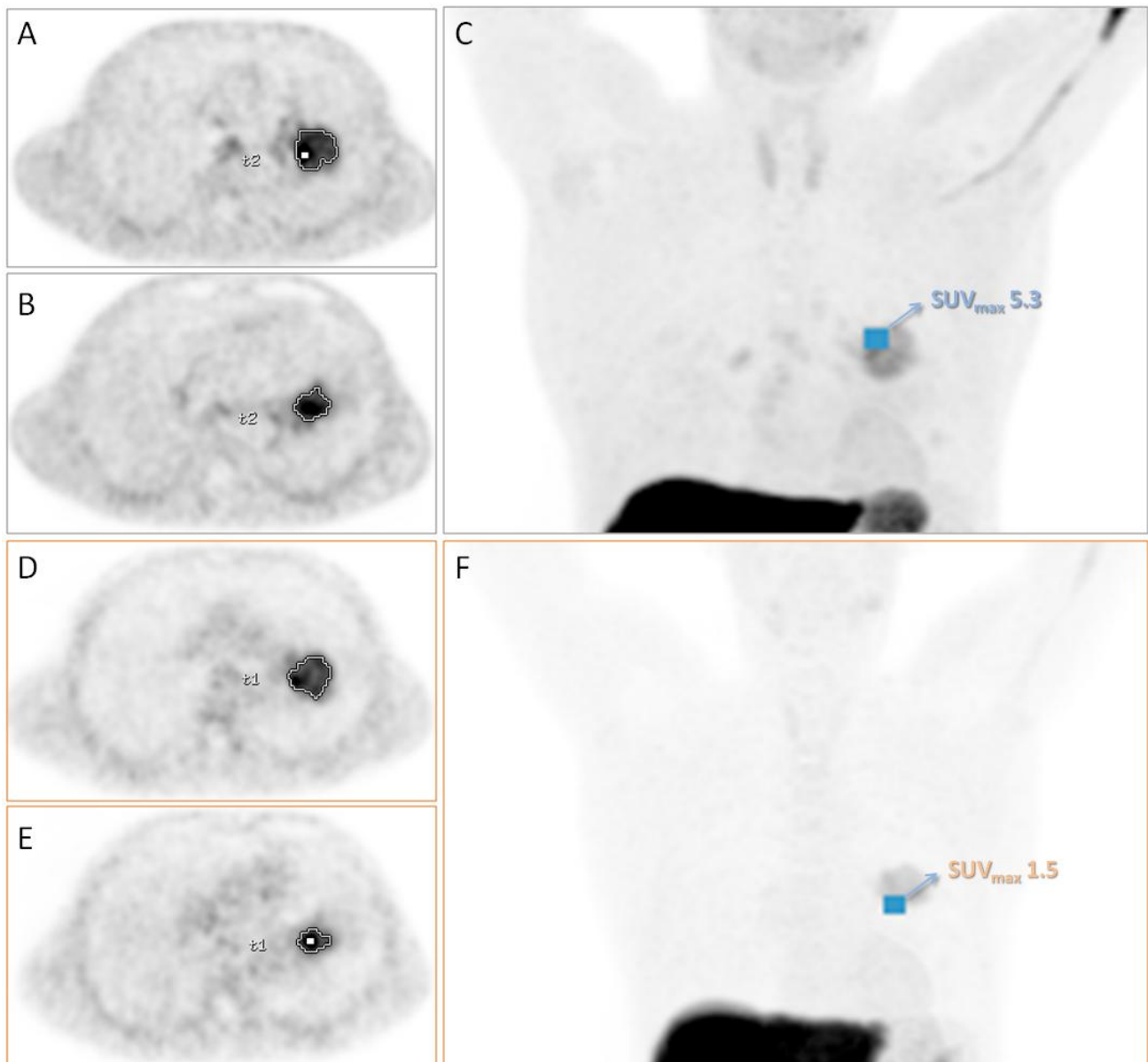


Figura 3: Le immagini sopra mostrano l'acquisizione precoce (A-C) e tardiva (D-F) alla ^{64}Cu -ATSM PET del paziente nr.3. Più specificamente, i pannelli a sinistra corrispondono a due sessioni assiali consecutive all'altezza della lesione, mentre i pannelli a destra corrispondono alle immagini MIP (maximum intensity projection), per le quali viene indicato il punto con il SUVmax più alto in entrambe le acquisizioni.

Anche se la presente ricerca ha arruolato un numero limitato di soggetti, i risultati fanno sperare in un'ampia applicabilità del metodo computerizzato basato sulla geometria frattale non solo per le analisi specifiche alla consistenza quantitativa dell'acquisizione precoce e tardiva alla ^{64}Cu -ATSM PET/TC, ma anche per una più vasta gamma di valutazioni della variabilità intratumorale, aumentando così la sua importanza diagnostica in medicina nucleare.

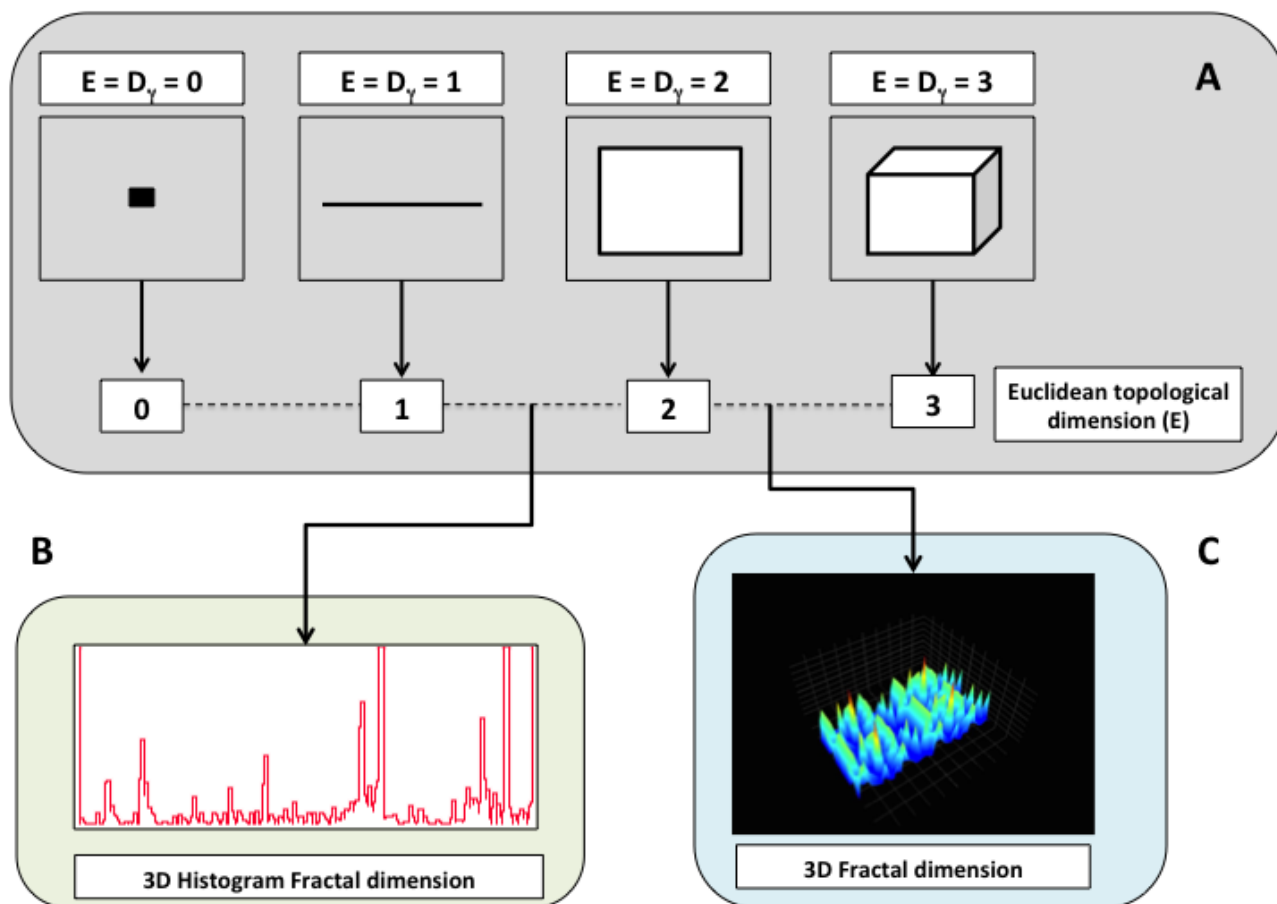


Figura 4: Confronto tra le due principali definizioni di "dimensione". La dimensione topologica assegna un numero intero ad ogni punto dello spazio euclideo, indicato con il simbolo E_3 , e attribuisce una dimensione di 0 al "punto", una dimensione di 1 alla "linea retta," una dimensione di 2 alla "superficie" e una dimensione di 3 per le figure "tre dimensionali". La seconda definizione di dimensione attribuisce un numero reale ad ogni oggetto naturale in E_3 , compresa tra la dimensione topologica e 3 (A). La dimensione topologica è indicato con il simbolo D_T e la dimensione frazionaria con il simbolo D . Per tutte le figure euclidee, D_T e D coincidono ($D_T = D$). Questa uguaglianza non è valido per gli oggetti naturali, incluso i biologici, perché risulta verificata una disuguaglianza $D > D_T$. Il SWI Analyzer stima automaticamente l'istogramma 2D (B) e 3D della dimensione frattale (C). Più D tende a 2 o 3, rispettivamente, più la conformazione analizzata tende a riempire lo spazio 2D o 3D, e maggiore è la sua complessità geometrica.

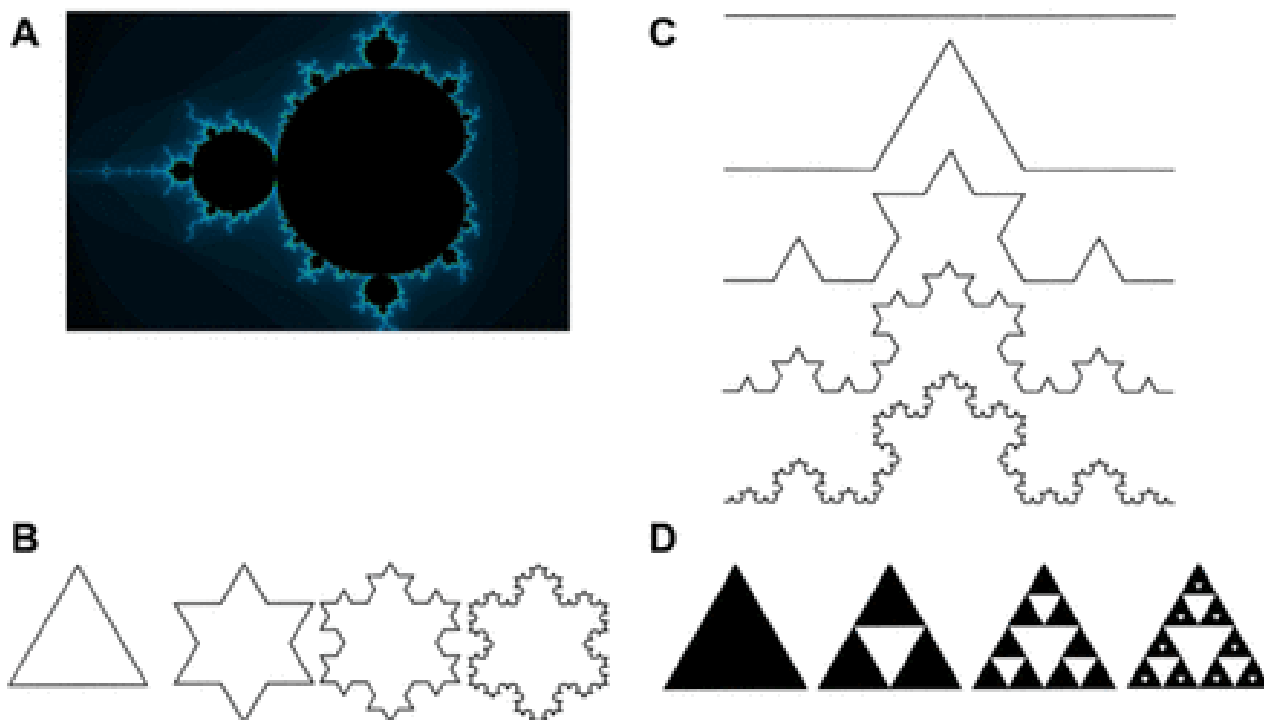


Figura 5: Esempi di oggetti frattali geometricamente auto simili; (a) l'insieme di Mandelbrot; (b) la "curva"; (c) il "fiocco di neve", e (d) il "triangolo di Sierpinski". Immagine tratta da Di Ieva et al. Neuroscientist 2013 [13].

CONCLUSIONI

I risultati del presente studio sembrano supportare l'uso della ^{64}Cu -ATSM PET/TC con acquisizione sia precoce che tardiva per la valutazione dell'ipossia tumorale, come confermato dall'analisi *ad hoc* delle immagini mediante la geometria frattale. Inoltre, la metodologia frattale computerizzata utilizzata appare promettente e potrebbe essere ampiamente usata in medicina nucleare, non soltanto per la sua capacità di quantificare l'eterogeneità strutturale, ma anche perché nel definire le alterazioni neoplastiche potrebbe prevedere l'evoluzione della malattia. Un po' di attenzione andrebbe tuttavia prestata all'impiego della captazione muscolare come tessuto di riferimento per la pianificazione dei volumi per radioterapia, in quanto il SUVmax del muscolo può mostrare alcune differenze tra le due scansioni.

BIBLIOGRAFIA

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. CA: a cancer journal for clinicians. 2015;65(1):5-29.

2. Dehdashti F, Mintun MA, Lewis JS, Bradley J, Govindan R, Laforest R et al. In vivo assessment of tumor hypoxia in lung cancer with ^{60}Cu -ATSM. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*. 2003;30(6):844-50.
3. Lopci E, Grassi I, Chiti A, Nanni C, Cicoria G, Toschi L et al. PET radiopharmaceuticals for imaging of tumor hypoxia: a review of the evidence. *American journal of nuclear medicine and molecular imaging*. 2014;4(4):365-84.
4. Lewis JS, McCarthy DW, McCarthy TJ, Fujibayashi Y, Welch MJ. Evaluation of ^{64}Cu -ATSM in vitro and in vivo in a hypoxic tumor model. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*. 1999;40(1):177-83.
5. Lewis JS, Sharp TL, Laforest R, Fujibayashi Y, Welch MJ. Tumor uptake of copper-diacetyl-bis(N(4)-methylthiosemicarbazone): effect of changes in tissue oxygenation. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*. 2001;42(4):655-61.
6. Nyflot MJ, Harari PM, Yip S, Perlman SB, Jeraj R. Correlation of PET images of metabolism, proliferation and hypoxia to characterize tumor phenotype in patients with cancer of the oropharynx. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*. 2012;105(1):36-40.
7. Dietz DW, Dehdashti F, Grigsby PW, Malyapa RS, Myerson RJ, Picus J et al. Tumor hypoxia detected by positron emission tomography with ^{60}Cu -ATSM as a predictor of response and survival in patients undergoing Neoadjuvant chemoradiotherapy for rectal carcinoma: a pilot study. *Diseases of the colon and rectum*. 2008;51(11):1641-8.
8. Lennon FE, Cianci GC, Cipriani NA, Hensing TA, Zhang HJ, Chen CT et al. Lung cancer-a fractal viewpoint. *Nature reviews Clinical oncology*. 2015.
9. Grassi I, Nanni C, Cicoria G, Blasi C, Bunkheila F, Lopci E et al. Usefulness of ^{64}Cu -ATSM in head and neck cancer: a preliminary prospective study. *Clinical nuclear medicine*. 2014;39(1):e59-63.
10. Di Ieva A, Grizzi F, Jelinek H, Pellionisz AJ, Losa GA. Fractals in the Neurosciences, Part I: General Principles and Basic Neurosciences. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*. 2013;20(4):403-17.
11. Falconer KJ. *The Geometry of Fractal Sets*, Cambridge University Press, 1985
12. Mandelbrot BB. *Gli oggetti frattali. Forma, caso e dimensione*. Einaudi ed. 2000.
13. Di Ieva A, Grizzi F, Jelinek F, et al. Fractals in the Neurosciences, Part I: General Principles and Basic Neurosciences. *Neuroscientists* 2013;20:403-417.

RINGRAZIAMENTI

(al-ḥamdu li-llāhi rabbi l-ālamīn)

Ogni ringraziamento va innanzitutto a Dio Onnipotente,
perché nulla può l'uomo senza il suo Creatore.

Voglio inoltre esprimere la mia gratitudine ai tre professori che mi hanno seguito in
questo percorso e dato il loro sostegno durante il dottorato,
il prof. Sandro Mattioli, il prof. Stefano Fanti e il prof. Arturo Chiti.
In particolare, ringrazio il prof. Fanti, che mi ha saputo valorizzare ancora una volta.

Un profondo ringraziamento va alla mia famiglia e a tutti coloro che nel mio percorso
sono stati amici, colleghi, compagni di “ventura”.
Grazie d’aver creduto in me e d’essermi stati affianco!

E per finire, citando qualcuno di più importante di me, “*the best is yet to come*”.